

**ÜBER DEN VERLAUF DES PTERIDINMUSTERS
BEIM HÜHNEREMBRYO UND DESSEN BEEINFLUSSUNG
DURCH THIOHARNSTOFF, L - THYROXIN
UND CYCLOHEXIMID**

JOHANN NAUMANN

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand : Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Über den Verlauf des Pteridinmusters beim Hühnerembryo
und dessen Beeinflussung durch Thioharnstoff,
L - Thyroxin und Cycloheximid

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johann Naumann
aus
Trautmannshofen

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Allgemeiner Teil	
1.1	Einleitung	1
1.2	Pteridine	2
1.2.1	Geschichte und Nomenklatur	2
1.2.2	Chemische und physikalische Eigenschaften	3
1.2.3	Stoffwechsel der Pteridine	4
1.2.3.1	Biosynthese	4
1.2.3.2	Katabolismus	6
1.2.4	Regulation der Pteridinsynthese	7
1.2.5	Vorkommen der Pteridine	8
1.2.6	Pteridine in Entwicklung und Wachstum	10
1.2.7	Coenzymfunktion der Pteridine	12
1.2.8	Medizinische Bedeutung der Pteridine	13
1.3	Entwicklung der Schilddrüse	16
1.4	Zur Wirkung von Thioharnstoff und L-Thyroxin	18
1.5	Zur Wirkung von Cycloheximid	22
2	Zielsetzung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Bruteier	25
3.2	Reagentien	25
3.3	Applikation der Substanzen	25
3.4	Probengewinnung	26
3.5	Aufarbeitung der Proben	28

3. 6	Pteridinbestimmung	29
3. 7	Creatininbestimmung	30
3. 8	Proteinbestimmung	31
3. 9	Volumenbestimmungen	31
3.10	Gewichtsbestimmungen	32
3.11	Statistische Berechnungen	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Pteridinbestimmung im Eiklar	33
4.2	Pteridinbestimmung im Eidotter	33
4.3	Pteridinbestimmung in der subembryonalen Flüssigkeit	33
4.4	Pteridinbestimmung in der Amnionflüssigkeit	34
4.5	Pteridinbestimmung in der Allantoisflüssigkeit	34
4.6	Pteridinbestimmung in der Leber	40
4.7	Pteridinbestimmung in der Niere	40
4.8	Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid	40
4.8.1	Einfluß auf den Schlupfzeitpunkt und die Überlebensrate	40
4.8.2	Einfluß auf allgemeine Parameter	47
4.8.2.1	Einfluß auf Allantois- und Amnionvolumen	47
4.8.2.2	Einfluß auf Embryogewicht und Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis	47
4.8.2.3	Einfluß auf das Feuchtgewicht von Leber und Niere	52
4.8.2.4	Einfluß auf den Proteingehalt der Leber und der Niere	52
4.8.3	Einfluß auf das Pteridinmuster	52

4.8.3.1	Einfluß auf das Pteridinmuster in der Amnion- und in der Allantoisflüssigkeit	52
4.8.3.2	Einfluß auf das Pteridinmuster in der Leber und in der Niere	53
5	Diskussion	69
6	Zusammenfassung	79
7	Literaturverzeichnis	83

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Die Pteridine sind erst in neuerer Zeit Gegenstand intensiver Forschungen geworden. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß sie noch zahlreiche Fragen, insbesondere was ihre Funktion und ihre Bedeutung im Organismus betrifft, aufwerfen.

Das Interesse der Forschung konzentrierte sich in den letzten Jahren auf die Funktion der Pteridine im Tumor- und Immungeschehen. Da das maligne Wachstum weitgehend dem embryonalen Wachstum gleicht, war es naheliegend, die Verteilung und den Stoffwechsel der Pteridine im Verlauf der Embryogenese zu untersuchen. Für die Untersuchungen bot sich der Hühnerembryo an. Obwohl es bereits einige Hinweise dafür gibt, daß die Pteridine für die Ontogenese von Bedeutung sind, ist ihre Rolle in der Entwicklung noch weitgehend unbekannt. Am Vogelei gibt es bisher in diese Richtung noch keine systematischen Untersuchungen.

1.2 Pteridine

1.2.1 Geschichte und Nomenklatur

Der Ursprung der Pteridinforschung kann bis in das letzte Jahrhundert zurückverfolgt werden. 1889 berichtete HOPKINS erstmals über ein gelbes Pigment aus den Flügeln des Zitronenfalters. Kurze Zeit später isolierte er auch das weiße Flügelpigment des Kohlweißlings (HOPKINS, 1895).

WIELAND und SCHÜPF (1925, 1926) gelang es, diese Pigmente weitgehend zu reinigen. Sie nannten die Pigmente Leukopterin und Xanthopterin, nach den griechischen Begriffen "xanthos" für gelb, "leukos" für weiß und "pteron" für Flügel.

Aber erst PURRMANN (1940a,b) konnte diese Farbstoffe synthetisch herstellen und ihre genaue Struktur aufklären.

Es gelang ihm sogar noch, die Struktur eines weiteren Insektenpigments, des Isoxanthopterin, festzustellen (PURRMANN, 1941).

Der Begriff "Pteridin" wurde erstmals von WIELAND verwendet, um die charakteristische heterocyclische Struktur dieser 3 Pigmente zu erfassen (SCHÜPF und REICHERT, 1941).

Unter Pterin versteht man demnach Pyrimido(4,5-b)-pyrazin, den Grundkörper aller natürlich vorkommenden Pteridinderivate (Fig.1).

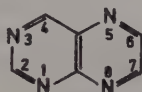
Die Bezeichnung "Pterin" war ursprünglich als Sammelbezeichnung für alle Insektenfarbstoffe gedacht (WIELAND und SCHÜPF, 1925). Erst PFLEIDERER (1964) machte den Vorschlag, den Begriff "Pterin" auf alle Derivate des 2-Amino-4-oxopterinidins (Fig.2) zu beschränken. Diese Bezeichnung hat sich inzwischen allgemein durchgesetzt. Die meisten der natürlich vorkommenden Pteridine sind Pterine mit Substituenten an Position 6, 7 oder 8 des Pteridingerüsts.

Pterine werden oft in 2 Gruppen eingeteilt, die konjugierten

und die unkonjugierten Pterine. Die konjugierten Pterine gehören zur Familie der Folsäuren und leiten sich von der Pteroinsäure ab. Unkonjugierte Pterine enthalten weder Glutamat noch p-Aminobenzoat.

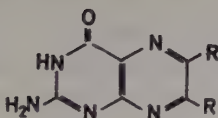
Die hier vorliegenden Untersuchungen beschränken sich auf Neopterin, Biopterin, Pterin und Isoxanthopterin.

Fig.1



Pteridin

Fig.2



Pterin

1.2.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Die Pteridine sind amphotere Substanzen. Sie gleichen in ihren Eigenschaften weitgehend den Purinen.

Sie bilden Metallchelate und schwerlösliche Quecksilber- und Silbersalze und neigen zur Komplexbildung mit Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren (TSAJITA and SAKURAI, 1963; LAGOWSKI and FORREST, 1967).

Sie kommen als oxidierte Formen und in zwei reduzierten Formen vor, den Dihydro- und Tetrahydropterinen, in Kurzschreibweise auch als H_2 - und H_4 -Pterine bezeichnet.

Ihre aromatische Struktur ist sehr photolabil. Insbesondere gilt dies für die reduzierten Formen, die zudem noch sehr empfindlich gegenüber Luftsauerstoff sind.

Während der Pteridingrundkörper sehr gut wasserlöslich ist, sind die meisten natürlich vorkommenden Pterine bei pH 7 nur sehr schwer löslich.

Alle Pteridine haben charakteristische UV-Absorptionsspektren. Die oxidierten Pteridine fluoreszieren nach Bestrah-



lung intensiv blau bis rot. Diese Eigenschaft wird auch bei der Pteridinbestimmung genutzt.

Pteridine neigen außerdem zur Oberflächenadhäsion.

1.2.3 Stoffwechsel der Pteridine

1.2.3.1 Biosynthese

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit mit den Purinen vermutete man schon seit langem, daß Purine Vorstufen der Pteridinbiosynthese sind. Die ersten Anhaltspunkte dafür lieferte ALBERT (1954). Er zeigte, daß nach Inkubation von Purinen mit Dicarbonylverbindungen bei 37°C geringe Pteridinmengen entstehen. Untersuchungen an Bakterien, Pilzen, Amphibien und Insekten ergaben dann auch, daß radioaktiv markierte Purine und Pyrimidine als Baustoffe bei der Pteridinsynthese verwendet werden (SHIOTA, 1971). BROWN (1971) bestätigte diese Befunde durch die Isolierung der Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase I (GTP-CH I), die GTP in H₂-Neopterintriphosphat umwandelt, welches generell als Ausgangsprodukt im Pteridin- und Folsäurestoffwechsel gilt.

Während über die Biosynthese von H₄-Biopterin eine Vielzahl von Untersuchungen vorliegt und dessen Syntheseweg nahezu geklärt ist, liegen über die Biosynthese der anderen Pteridine, die Gegenstand dieser Arbeit sind, nur sehr spärliche Angaben vor.

Von Neopterin wird angenommen, daß es aus H₂-Neopterintriphosphat durch Dephosphorylierung entsteht (FUKUSHIMA et al., 1975). Durch Abspaltung der Seitenkette kann aus H₂-Neopterin H₂-Pterin gebildet werden. Für Pterin und eine Reihe anderer Pteridine haben FUKUSHIMA und SHIOTA (1974) gezeigt, daß sie im Gegensatz zu Biopterin auch aus Folsäure gebildet werden können. Die Biosynthese von Isoxanthopterin wird beim Abbau der Pteridine erläutert.

Für H_4 -Biopterin werden verschiedene Synthesewege diskutiert.

Nach dem derzeitigen Stand der Erkenntnis dominiert unter normalen Stoffwechselbedingungen der "de novo" pathway, auch als H_4 -pterin pathway bezeichneter Syntheseweg (SMITH and NICHOL, 1984, 1986; SWITCHENKO and BROWN, 1984; CURTIUS et al., 1985).

H_2 -Neopterintriphosphat wird durch die 6-Pyruvoyl- H_4 -Pterin-Synthetase in Anwesenheit von Mg^{2+} in 6-Pyruvoyl- H_4 -Pterin (H_4 -Pterin 1) umgewandelt. Dieses H_4 -Pterin 1 kann unter Mitwirkung von NADPH in H_4 -Pterin 2, dessen Identität noch nicht genau bekannt ist, oder in 6-Lactoyl- H_4 -Pterin (reduziertes Sepiapterin) umgesetzt werden. Die Sepiapterinreduktase katalysiert die Bildung von H_4 -Biopterin aus den zuletzt genannten Zwischenprodukten.

Bereits vor dem H_4 -Pterin-Syntheseweg war der H_2 -Syntheseweg, als "salvage" pathway bezeichnet, bekannt (FUKUSHIMA, 1974; KRIVI and BROWN, 1979). Nach TANAKA (1981) wird dabei aus H_2 -Neopterintriphosphat in Anwesenheit von Mg^{2+} durch eine als A_2 bezeichnete Enzymfraktion in das Zwischenprodukt X (vermutlich 6-(1,2-dioxopropyl)-7,8-dihydropterin) überführt. Aus diesem Zwischenprodukt wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion Sepiapterin gebildet. Sepiapterin wird durch die Sepiapterinreduktase in H_2 -Biopterin umgewandelt. Die Dihydrofolatreduktase (Dihydropterinreduktase) reduziert H_2 -Biopterin zu H_4 -Biopterin.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß eine Hemmung der Dihydrofolatreduktase durch Methotrexat (DUCH et al., 1983) die H_4 -Biopterin-Synthese nicht beeinträchtigt wird, konnte dieser Syntheseweg für die Neubildung von H_4 -Biopterin ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit wurde von GAL et al. (1982) vorgeschlagen. GTP wird in chinoides H_2 -Neopterintriphosphat umgewandelt. Über eine H_2 -Biopterin-Synthetase entsteht chinoides H_2 -Biopterin, daß durch die Dihydropteridinreduktase zu H_4 -Biopterin reduziert wird.

1.2.3.2 Katabolismus

Deutlich mehr Kenntnisse als über die Synthese von Pteridinen hat man über ihren Abbau.

Nach REMBOLD et al. (1969 a, b, 1971 a, b) und REMBOLD und GUYRE (1972) vollzieht sich der Abbau von H_4 -Neopterin und H_4 -Biopterin in 3 Stufen: Abspaltung der Seitenkette, Desaminierung des Pteridinrings und Oxidation an Position 6 der Ringstruktur.

Die Polyhydroxyalkylseitenkette wird in nichtenzymatischer Reaktion oxidativ als Aldehyd abgespalten. Es entsteht $7,8-H_2$ -Pterin. Dieses kann sowohl von der Pterindesaminase zu $7,8-H_2$ -Lumazin, als auch durch die Xanthinoxidase (XOD) zu H_2 -Xanthopterin abgebaut werden. Je nachdem, ob eine Pterindesaminase beteiligt ist oder nicht, endet der Pteridinabbau auf der Stufe einfacher Pteridine oder Lumazine. Die Desaminasen sind sehr substratspezifisch. Bisher sind eine Pterindesaminase, eine Sepiapterindesaminase und eine Isoxanthopterin-desaminase beschrieben worden.

Pteridine und Lumazine sind gleichwertige Substrate für die Xanthinoxidase. Beide Pteridine werden vom Enzym an Position 7 des Pteridinringes hydroxyliert. Bei H_2 -Verbindungen wird an Position 6 der Ringstruktur oxidiert. Bereits 1944 hatten WIELAND und LIEBIG gezeigt, daß die XOD Pteridine umsetzen kann. In diesem Zusammenhang führte FORREST et al. (1956) einen interessanten Versuch durch. Sie fanden bei einer Mutante von *Drosophila*, die keine XOD-Aktivität aufwies, nur Pterin, während bei der Wildform auch Isoxanthopterin vorkam. Dies bestätigte, daß die XOD für die Bildung von Isoxanthopterin aus Pterin verantwortlich ist. Dieses Enzym kommt auch in einer Dehydrogenaseform vor, die im Gegensatz zur Oxygenaseform molekularen Sauerstoff nicht direkt verwerten kann und auf NADH angewiesen ist.

1.2.4 Regulation der Pteridinsynthese

Es sind bisher lediglich Untersuchungen zur Regulation der Synthese von H_4 -Biopterin bekannt.

VIVEROS et al. (1981), ABOU-DONIA et al. (1985) und DUCH et al. (1986) stellten eine hormonale Regulation der Aktivität der GTP-CH und des H_4 -Biopterinspiegels in der Nebennierenrinde fest. ACTH (adrenocorticotropes Hormon) führte zu einer Stimulierung der Aktivität der GTP-CH und zu einer Erhöhung der H_4 -Biopterin-Konzentration. Das läßt darauf schließen, daß die H_4 -Biopterinsynthese in der Nebennierenrinde unter dem Einfluß der Hypophyse steht. Nach Hypophysektomie nämlich kam es zu einem Abfall der GTP-CH-Aktivität und der H_4 -Biopterinkonzentration in der Nebennierenrinde, aber auch in anderen Organen, insbesondere in der Milz, im Knochenmark (DUCH et al., 1986) und in der Leber (ABOU-DONIA, 1985).

Thyroidektomie und Adrenalektomie führten ebenfalls zu einem Abfall der H_4 -Biopterinsynthese in den erwähnten Organen. Die Adrenalektomie führte jedoch in der Leber zu einer Erhöhung der GTP-CH-Aktivität bei nahezu unverändertem H_4 -Biopterin-Spiegel. Die H_4 -Biopterin-Synthese im Gehirn blieb völlig unbeeinflusst bei den genannten Manipulationen (DUCH et al., 1986).

Die Gabe von Reserpin und Insulin (beide Pharmaka führen zu einer vermehrten Entladung des N. splanchnicus) verursachte sowohl in Nebennierenmark als auch in Nebennierenrinde einen erhöhten H_4 -Biopterinegehalt. (VIVEROS et al., 1981). Interessanterweise waren beide Effekte durch Cycloheximid aufhebbar. Auch die Substrate von Enzymen, bei denen H_4 -Biopterin als Cofaktor benötigt wird, haben einen regulierenden Einfluß auf den H_4 -Biopterinspiegel. So bewirkte die Gabe von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan einen deutlichen Anstieg des H_4 -Biopterinspiegels im Blut bei gesunden Versuchspersonen (LEEMING et al., 1976).

1.2.5 Vorkommen der Pteridine

Bei fast allen Tierklassen, bei zahlreichen Arten von Mikroorganismen und selbst bei Pflanzen sind bisher Pteridine nachgewiesen worden.

Bei zur Photosynthese befähigten Bakterien ist ein deutlicher Anstieg des Pteridingehalts während der Photosyntheseaktivität zu beobachten. Es wird dabei eine Rolle der Pteridine als primäre Elektronenakzeptoren diskutiert (FULLER and NUGENT, 1969).

Bei der Lumineszenz von Bakterien spielen insbesondere die Lumazine, die ja auch Abbauprodukte von Pterinen sein können, eine wichtige Rolle (SMALL et al., 1980).

Für die Farbgebung der Schmetterlingsflügel sind nach WATT und BOWDEN (1966) vor allem 4 Pteridine, nämlich Xanthopterin und Sepiapterin für Gelb, Leukopterin für weiß und Erythropterin für rot.

Die rote Pigmentfarbe der Augen von *Drosophila melanogaster* (LEDERER, 1939) beruht auf dem Gehalt an Drosopterinen.

Drosopterine kommen sonst bei Insekten nicht vor.

In den Eiern von *Phyrrhocoris apterus* wurde eine Reihe von Pteridinen gefunden, unter anderem auch Isoxanthopterin (SMITH and FORREST, 1969). Die Rotfärbung der Eier von *Oncopeltus fasciculatus* ist auf Erythropterin zurückzuführen (FORREST et al., 1966).

Eine Reihe von Pteridinen kommt in der Haut und in den Augen von Fischen (ZIEGLER, 1956; MORI et al., 1960) und Amphibien (HAMA and OBIKA, 1960) und in der Haut von Reptilien (BLAIR and GRAHAM, 1960) vor. Sie sind in der Haut in sogenannten Chromatophoren bzw. Pterinosomen lokalisiert. In diesem Zusammenhang soll auch darauf hingewiesen werden, daß H_4 -Biopterin als Cofaktor der Tryptophanhydroxylase für die Bildung von Melatonin von Bedeutung ist.

In den Geweben von Säugern liegt Biopterin zu über 90% als H_4 -Biopterin vor. Die Hypophyse weist die höchste Biopterinkonzentration auf. Leber, Niere, Nebenniere, Knochenmark und Milz enthalten ebenfalls vergleichsweise hohe

Mengen, während der Gehalt in Gehirn mit Ausnahme von Thalamus und Hypothalamus, in Herz, Hoden und Ovar relativ gering ist (DUCH et al., 1984).

Die Leber verschiedener Spezies ist von HASLER und NIEDERWIESER (1986) bezüglich der Pteridinmetaboliten Neopterin, Biopterin, Pterin und Isoxanthopterin untersucht worden.

Neopterin wurde nur beim Menschen in der Leber in sehr hoher Konzentration nachgewiesen. Biopterin kommt generell bei allen untersuchten Spezies in größeren Mengen vor.

Pterin zeigte selbst bei der gleichen Spezies individuell sehr unterschiedliche Werte. Isoxanthopterin konnte nur in der Schweineleber in Spuren nachgewiesen werden.

Im selben Versuch wurde auch die Aktivität von für die Pteridinsynthese wichtigen Enzymen in der Leber untersucht. Bei Mensch, Ratte und Huhn trat eine sehr hohe Sepiapterinreduktase-Aktivität auf. Auffälligerweise war gerade in der Fischleber die Aktivität der GTP-CH und der Pyruvoylsynthetase am höchsten.

DHONDT et al. (1986) schreiben der Niere eine wichtige Funktion im Pteridinstoffwechsel zu. Auf Grund der Tatsache, daß das Neopterin/Biopterin-Verhältnis im Serum wesentlich höher ist als im Urin und die Biopterinclearance höher ist als die Neopterinclearance, schlossen sie, daß ein Teil des ausgeschiedenen Biopterins in der Niere synthetisiert wird.

HÄBERLE et al. (1978) kamen ebenfalls zu dem Schluß, daß in der Niere Biopterin synthetisiert wird, da die Exkretionsrate von Biopterin deutlich über der Filtrationsrate liegt.

Im Augengewebe von Menschen und Ratten wurde Biopterin, zudem auch Neopterin und Sepiapterin nachgewiesen. Sie scheinen eine Schutzwirkung für das Auge vor Sonnenstrahlung zu bieten.

ANDONONSKAJA-RENN und ZEITLER (1983) haben das Pteridinmuster und den Pteridingehalt in den Blutzellen von Mensch und Hund bestimmt. Dabei zeigte sich, daß Biopterin in der Erythrozytenfraktion beim Hund sehr hoch ist, während Neopterin im Gegensatz zum Menschen sehr niedrig ist.

Sowohl Neopterin, als auch Biopterin wurden in sehr hoher Konzentration im menschlichen Urin gefunden (FUKUSHIMA and NIXON, 1980). Beim erwachsenen Menschen ist der Biopterinspiegel bei Männern niedriger als bei Frauen (STEA et al., 1980). Die Pteridinkonzentration generell ist nach FUKUSHIMA und NIXON (1980) im Urin 300 bis 1000 mal höher als im Serum. Außer beim Menschen, beim Affen und beim Beagle lassen sich bei Säugern keine nennswerten Konzentrationen von Neopterin im Urin feststellen (DUCH et al., 1984). Ähnlich liegen die Verhältnisse auch im Serum (ROKOS et al., 1985).

1.2.6 Pteridine in Entwicklung und Wachstum

Es gibt Hinweise dafür, daß die Pteridine bei der Entwicklung und beim Wachstum von Bedeutung sind.

So stellte ZIEGLER (1965) fest, daß die Pteridinkonzentration in der ersten Phase der Larvalentwicklung bei Amphibien sowie bei der Differenzierung und beim Beginn der Metamorphose stark zunehmen.

In den Eiern von *Phyllorcoris apterus* (SMITH and FORREST, 1969) steigt der Gehalt von Isoxanthopterin und Erythropterin während der Entwicklung besonders vom 9. bis zum 12. Tag stark an.

Sepiapterin kommt in der Haut von Axolotl-Larven vor, aber nicht mehr beim adulten Tier (FROST et al., 1984).

In der Amnionflüssigkeit und im Urin von schwangeren Frauen findet man einen deutlichen Anstieg der Neopterinkonzentration (BICHLER et al., 1983).

Auffallend ist, daß bei Kindern die Pteridinkonzentration im Urin höher ist als bei Erwachsenen (NIEDERWIESER et al., 1980). DHONDT et al. (1981) nehmen auf Grund der Befunde, daß sich das Neopterin/Biopterin-Verhältnis während der ersten 2 Lebensjahre beim Menschen noch laufend verändert, an, daß in diesem Zeitraum erst eine vollständige Ausbildung des Pteridinstoffwechsels erfolgt.

Daraus und aus der Tatsache, daß menschliche Milch einen hohen Biopteringehalt aufweist, ergibt sich nach MATSUBARA und GAULL (1985) die Vermutung, daß die Aufnahme von Pteridinen für die Entwicklung des Kleinkindes eine Rolle spielt, welche aber bisher nicht genauer definiert werden konnte.

Ontogenetische Studien am Gehirn von Ratten (KAPATOS, 1983) zeigen Unterschiede im Verlauf der H_4 -Biopterin-Konzentration in Gehirn und Hypophyse. Während der Gehalt in der Hypophyse pränatal sehr niedrig ist und erst 3 bis 5 Tage nach der Geburt den Wert erwachsener Tiere erreicht, ist der H_4 -Biopteringehalt des Gehirns 2 Tage vor der Geburt am höchsten und verringert sich nach der Geburt wieder. Im Mittelhirn erreicht der H_4 -Biopteringehalt 12 Tage nach der Geburt ein Maximum und fällt dann wieder ab.

Die Beobachtungen an Bakterienkulturen, daß Pteridine immer dann vermehrt auftreten, wenn die Proliferation aufhört und die Differenzierung beginnt, veranlaßten WACHTER et al., (1982) zur Annahme, daß Pteridine durch die Aktivierung oder Inaktivierung inhibitorisch wirksamer Substanzen einen wachstumsregulierenden Effekt haben. In einer anderen Hypothese der gleichen Autoren wird vermutet, daß Pteridine m-RNA-Abschnitte maskieren können, die die Transkription behindern. Die Pteridinkonzentration könnte laut WACHTER et al. leicht über die Permeabilität der Zellmembran kontrolliert werden. Ein hoher Histamingehalt, wie er in proliferierendem Gewebe auftritt, würde durch die Erhöhung der Membranpermeabilität die Pteridinkonzentration der Zelle verringern. Eine weitere Theorie von WACHTER et al. geht davon aus, daß die Regulation des Wachstums mit sogenannten Zielzellen verknüpft ist. Diese besitzen Pteridin-bindende Rezeptoren. Der Pteridin-Rezeptorkomplex gelangt in den Zellkern und lagert sich an bestimmte Stellen des Chromatins an, wo er die Transkription beeinflusst.

Bei *Oncopeltus* wirken sich Xanthopterin und Isoxanthopterin negativ auf die DNA- und RNA-Synthese im Ei aus (HARRIS and

FORREST, 1967). HARRIS und FORREST nehmen an, daß Isoxanthopterin, dessen Gehalt sich während der Entwicklung nicht verändert im Gegensatz zu Xanthopterin, an ein spezielles Protein gebunden ist, welches über die Freisetzung des Pteridins einen wachstumsregulierenden Effekt ausübt.

L'HELIAS et al. (1984) entdeckten, daß synthetisches Biopterin und Pterin bei *Drosophila* letale Mutationen hervorrufen. Sie vermuten, daß diese Pteridine über einen nicht näher bekannten Mechanismus die Gonadenentwicklung beeinflussen.

Auch Regenerationsprozesse scheinen mit Pteridinen im Zusammenhang zu stehen. Die Schwanzregeneration der Eidechsenart *Triturus cristatus* äußert sich in einem Anstieg der H_4 -Biopterinkonzentration in der Haut der Regenerationsknospe. Während der weiteren Regeneration tritt vermehrt Isoxanthopterin auf. Der Anstieg von H_4 -Biopterin kann durch Isoxanthopterin und Chloramphenicol unterbunden werden. Reserpin hingegen hat den gegenteiligen Effekt und fördert die Regeneration (KOKOLIS et al., 1972).

Insgesamt müssen die Kenntnisse über die Funktion der Pteridine im Entwicklungsgeschehen als unbefriedigend angesehen werden.

1.2.7 Coenzymfunktion der Pteridine

KAUFMANN gelang es erstmals, die Coenzymfunktion eines hydrierten Pteridins im Stoffwechsel zu zeigen (KAUFMANN and FISHER, 1962). H_4 -Biopterin ist als Coenzym bei der Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin durch die Phenylalaninhydroxylase beteiligt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß H_4 -Biopterin auch für die Tyrosinhydroxylase (NAGATSU et al., 1964), die Tryptophanhydroxylase (FRIEDMANN et al., 1972) und die Alcyglycerolmonooxygenase (TIETZ et al., 1964) als Cofaktor agiert. Diese Enzyme mit Ausnahme des zuletztgenannten spielen eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Katecholaminen wie Dopamin, Adrenalin, Epinephrin und Noradrenalin, und Indolaminen wie Serotonin und Melatonin. H_4 -Biopterin stellt damit einen begrenzenden Faktor bei der Synthese

von wichtigen Hormonen und Neurotransmittern dar. Neben H_4 -Biopterin wird auch Molybdopterin eine wichtige Rolle als Cofaktor für eine Reihe von Enzymen unter anderem der Molybdänidase und der Aldehydoxidase zugesprochen (NICHOL et al., 1985).

1.2.8 Medizinische Bedeutung der Pteridine

Eine Reihe von Stoffwechseldefekten, die die Katecholaminsynthese und die Bildung von Neurotransmittern betreffen, sind auf Störungen der H_4 -Biopterinsynthese zurückzuführen. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die atypische Phenylketonurie (CURTIUS et al., 1979). Auf Grund der Cofaktorfunktion bei der Synthese einiger Neurotransmitter ist anzunehmen, daß bei einigen neurologischen und psychischen Erkrankungen ein Zusammenhang mit einem erniedrigten H_4 -Biopterinspiegel in Blut, Urin und Cerebrospinalflüssigkeit besteht (SMITH et al., 1974; LOVENBERG et al., 1979; CURTIUS et al., 1982). Der therapeutische Einsatz von H_4 -Biopterin zeigte gerade bei der atypischen Phenylketonurie, aber auch bei neurologischen Erkrankungen teilweise Erfolge (KAUFMANN et al., 1983; SMITH et al., 1985).

Besonderes Interesse haben die Pteridine im Zusammenhang mit ihrem vermehrten Auftreten bei Tumoren gefunden. Die Biopterinkonzentration im Serum und in den Erythrozyten zeigt bei verschiedenen Tumorarten einen signifikanten Anstieg. Erhöhte Neopterinkonzentrationen und zum Teil auch erhöhte Konzentrationen anderer Pteridine und Lumazine wurden bei diversen Neoplasieformen gemessen (ROKOS et al., 1980; HAUSEN et al., 1982; FUCHS et al. 1984a; STEA et al., 1981). HALPERN et al. (1977) stellten fest, daß 6-Hydroxymethylpterin ein spezieller Metabolit des Tumorstoffwechsels in Zellkulturen ist. Enzyme des Pteridinstoffwechsels, wie die Dihydropterinreduktase und die Sepiapterinreduktase sind in neoplastischen aber auch in fetalen Geweben in ihrer Aktivität erhöht (SANCHEZ-URRETIA et al., 1978; KATO

et al., 1979).

Erhöhte Serum- und Urin-Pteridinwerte wurden auch bei verschiedenen viralen Infektionskrankheiten, unter anderem auch AIDS (WACHTER et al., 1979; KERN et al., 1984), bei Autoimmunkrankheiten wie primärer chronischer Arthritis und ulzerativer Colitis (HAUSEN et al., 1983; NIEDERWIESER et al., 1985), und bakteriellen und Protozoeninfektionen mit intrazellulärer Zellvermehrung, unter anderem Tuberkulose (FUCHS et al., 1984b), Lepra (SCHMUTZHARDT et al., 1984a) und Malaria (SCHMUTZHARDT et al., 1984b) festgestellt.

Demnach stellen Pteridine keine spezifischen Tumormarker dar. Jedoch wird insbesondere Neopterin als Indikator der Tumormunität und der Malignität von Tumoren betrachtet. Darüberhinaus scheinen sich Pteridine für die Verlaufskontrolle von Tumoren zu eignen. (AULITZKY et al., 1984; FUCHS et al., 1984b).

Pteridine sind auch im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen untersucht worden. So zeigt Biopterin in Plasma- und Blutzellen nach graft versus host-Reaktionen einen deutlichen Anstieg. Auch der Neopteringehalt des Urins steigt dabei an. (FINK et al., 1983; ZIEGLER et al., 1985).

1 bis 2 Tage vor der klinisch manifesten Abstoßungsreaktionen zeigt der Neopterinspiegel im Urin einen deutlichen Peak (FINK et al., 1983).

Aus den erwähnten Befunden geht hervor, daß Pteridine im Verlauf der Immunzellproliferation vermehrt gebildet werden. FUCHS et al. (1982) zeigten, daß Pteridine als Marker der alloantigen-induzierten Lymphozytenproliferation (T-Zellen) angesehen werden können.

Pteridine können aber nicht nur als Produkte bei der Lymphozytenproliferation gesehen werden, sie sind auch an deren Regulation beteiligt. Die Aktivierung der Lymphozytenbildung durch Concanavalin-A wird durch hydrierte Pteridine wie H₄-Biopterin, H₂-Biopterin und Sepiapterin unterstützt, während Xanthopterin und eine Reihe anderer Pteridine eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation zeigen (ZIEGLER

et al., 1983).

In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise für eine positive Modulation der Interleukin II-2-Aktivität durch H_4 -Biopterin (ZIEGLER et al., 1984). Der genaue Mechanismus ist allerdings nicht bekannt.

Schließlich konnten HUBER et al. (1984) auch zeigen, daß die Freisetzung von Neopterin und Biopterin aus Makrophagen von Interferon-gamma kontrolliert wird.

TROPPMAIR et al. (1985) entdeckten, daß dabei die Aktivität der GTP-Cyclohydrolase stimuliert wird, wodurch es zu einer vermehrten Neopterin- und Biopterinsynthese und schließlich zu einer erhöhten Pteridinausscheidung kommt.

1.3 Entwicklung der Schilddrüse

Die Schilddrüse entsteht als Ausstülpung des Pharynxbodens am 2.Tag der Inkubation und teilt sich am 4.Tag in zwei Lappen (BRADWAY, 1929; HOPKINS, 1935; ROMANOFF, 1960). Während nach Angaben von HOPKINS (1935), HANSBOROUGH und KHAN (1951) und STOLL und BLANQUET (1952) zwischen 10. und 11.Tag erstmals deutlich ausgebildete Follikel auftreten, stellte HILFER (1964) die ersten Anzeichen für eine Follikelbildung bereits am 8.Entwicklungstag fest.

Die zunächst intrazellulär vorkommenden Kolloidtröpfchen ergeben nach Vermehrung und Umstrukturierung der Zellen extrazelluläres Kolloid (BRADWAY, 1929). Am 15.Tag ist nach THOMMES (1958) die histologische Ausdifferenzierung und die Ausbildung des Gefäßsystems dieses Organs abgeschlossen. Monojodtyrosin und L-Thyroxin wurden von TRUNNEL und WADE (1955) und DAUGERAS et al. (1976) etwa gleichzeitig mit dem Auftreten von Follikeln zwischen 9. und 11.Tag nachgewiesen. SHAIN et al. (1972) gelang der Nachweis von Jodtyrosinen in der Schilddrüsenanlage bereits am 2.Bebrütungstag. Es überrascht daher nicht, daß THOMMES und HYLKA (1977) L-Thyroxin bereits am 7.Tag der Entwicklung im Serum messen konnten. Da in dieser frühen Entwicklungsphase aber weder eine Aktivität der Peroxidase zur Oxidation von Jodid nachweisbar ist (TAUROG, 1970), noch ein direkter Anschluß der Schilddrüse an den Kreislauf gegeben ist (THOMMES, 1958), muß angenommen werden, daß Jodtyrosine auch an anderer Stelle im Ei gebildet werden können oder bereits vor der Inkubation im Ei vorhanden sind. THOMMES et al. (1977) vermuten, daß die Schilddrüsenhormone zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt für den Organismus keine wichtige physiologische Bedeutung haben.

Eine Reihe von Autoren versuchte, die Funktion der Schilddrüse an Hand ihrer Fähigkeit zur Jodaufnahme zu charakterisieren. HANSBOROUGH und KHAN (1951) beobachteten am 10.Tag der Bebrütung eine Ansammlung von radioaktiv markiertem Jod

in der Schilddrüse. TRUNNEL und BRAYER (1953) zeigten dagegen, daß bereits am 5.Tag der Inkubation die Jodkonzentration in der Schilddrüse die des Herzmuskels um das 50-fache übertrifft. WOLLMANN und ZWILLING (1953) konnten am 7 Tage alten Embryo in der Schilddrüse eine im Vergleich zum Blut 400-bis 700-fach höhere Jodkonzentration nachweisen. Ein sehr deutlicher Anstieg der Jodaufnahme (TRUNNEL and BRAYER, 1953), des Gehalts an Jodtyrosinen in der Schilddrüse (DAUGERAS et al., 1976) und des Plasma-Thyroxinspiegels (THOMMES et al., 1977) ist zwischen 11. und 13.Tag zu beobachten. Nach THOMMES und HYLKA (1977) nimmt L-Thyroxin im Plasma vom 10. bis zum 20.Tag deutlich zu. Der Trijodthyronin-Spiegel hingegen steigt erst ab dem 12.Tag an und zeigt zwischen dem 15.Tag und dem Schlupf die größte Zunahme. Die starke Zunahme von Trijodthyronin führen BORGES et al. (1980) auf die Ausbildung des peripheren Thyroxin-5-Monooxygenase-Systems zurück.

L-Thyroxin und Trijodthyronin kommen beim Vogel in einem Verhältnis von 6:4 im Serum vor. Beim Säuger ist dieses Verhältnis 9:1 (WENDHSWORTH and MELLEN, 1961). Die Schilddrüsenhormone sind beim Vogel an Albumin und Präalbumin gebunden (HENNINGER and NEWCOMER, 1964). Ein spezielles Thyroxin-bindendes Globulin wie beim Menschen gibt es beim Vogel nicht. Wahrscheinlich auf Grund der schwächeren Proteinbindung liegt die biologische Halbwertszeit von L-Thyroxin und Trijodthyronin mit 8,3h deutlich niedriger als beim Säuger (HENNINGER and NEWCOMER, 1964).

Während der frühen Entwicklungsphase bis zum 12.Tag scheint die Ausbildung der Schilddrüse von einer übergeordneten Steuerung durch Hypothalamus bzw. Hypophyse unabhängig zu sein. Später ist jedoch die physiologische Weiterentwicklung und die Funktion des Organs von einer hormonellen Steuerung abhängig (THOMMES and HYLKA, 1978). Untersuchungen dieser Autoren zeigten, daß eine Sensitivität der Schilddrüse für exogenes thyreotropes Hormon bereits am 7.Tag der Entwicklung besteht.

1.4 Zur Wirkung von Thioharnstoff und L-Thyroxin

Im Folgenden soll die Wirkung des Thioharnstoffs und der Schilddrüsenhormone nur soweit behandelt werden, wie sie hinsichtlich der Embryonalentwicklung, des Wachstums und des Schlupfes von Bedeutung ist.

Es ist unbestritten, daß L-Thyroxin die Brutdauer verkürzen kann. Die Applikation von L-Thyroxin am 17.Tag (OPPENHEIM, 1973; WEISS, 1979; WITTMANN et al., 1984) bzw. zwischen 18. und 19.Tag (FREEMANN, 1964) bewirkt einen um ca. 1 Tag vorverlegten Schlupf. Selbst die Gabe von L-Thyroxin kurz vor Beginn der Bebrütung (BEYER, 1962) führte zu einer um 1 bis 1 1/2 Tage verkürzten Brutdauer. Dies ist insofern erstaunlich, als die biologische Halbwertszeit des Hormons nur ca. 8,3h beträgt (HENNINGER and NEWCOMER, 1964).

Im Gegensatz dazu wird durch Thioharnstoff der Schlupf verzögert. Die Dauer der Schlupfverzögerung ist sowohl vom Applikationszeitpunkt, als auch von der Dosierung abhängig. Während die Gabe von 1mg Thioharnstoff pro Ei am 17.Tag den Schlupf nur um 1 Tag verzögert, führt die gleiche Dosierung, am 10.Tag verabreicht, zu einer Verzögerung des Schlupfs um 3 Tage (GROSSOWICZ, 1946). ROMANOFF und LAUFFER (1956) bestätigten den Befund, daß die Entwicklungsverzögerung um so ausgeprägter ist, je früher der Thioharnstoff appliziert wurde. Nach GROSSOWICZ (1946) zeigte eine Steigerung der Dosierung von 1mg auf 2mg statt einer Verlängerung der Inkubation um einen Tag eine Verzögerung um 3 bis 7 Tage. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch ROMANOFF und LAUFFER (1956). Die Versuche von GROSSOWICZ und ROMANOFF und LAUFFER zeigten allerdings auch, daß mit einer Zunahme der Dosierung bzw. der Inkubationsdauer auch die Verluste sehr stark ansteigen. WEISS (1979) konnte bei der Gabe größerer Mengen Thioharnstoff trotz einer verlängerten Überlebensdauer des Embryos im Ei keinen Schlupf mehr beobachten. WITTMANN et al. stellten 1984 fest, daß bei hoher Thioharnstoffdosierung der Schlupf völlig verhindert wird.

Die Eingriffe in das Schlupfgeschehen manifestieren sich in der Veränderung diverser Parameter.

Ein vorzeitiger Schlupf ist nach OPPENHEIM (1973) und WITTMANN et al. (1984) mit einer vorzeitigen Auslösung der Lungenatmung verknüpft. Unter normalen Umständen setzt die Lungenatmung zwischen 19. und 20. Tag der Entwicklung ein, nach L-Thyroxin-Applikation bereits zwischen 18. und 19. Tag. WITTMANN et al. (1984) zeigten, daß der Einleitung der Lungenatmung ein Anstieg der Motilität folgt, welcher schließlich zum Schlupf führt. Offensichtlich ist der Schlupf an die Funktion der Lungenatmung gekoppelt. Im Gegensatz zu L-Thyroxin hat Thioharnstoff eine Verzögerung der Einleitung der Lungenatmung zur Folge (WITTMANN et al., 1984; SCHMIDT, 1986), die bei hoher Dosierung sogar völlig unterdrückt werden kann. SCHMIDT untersuchte den Mechanismus, der der Einwirkung von Thioharnstoff und L-Thyroxin zu Grunde liegt, näher. Demnach führt die einsetzende Lungenatmung zu einem deutlichen Anstieg der Kallikrein-Aktivität und einem Plateau im Anstieg des Angiotensin-Converting-Enzyms. Kallikrein bewirkt die Bildung von Bradykinin, und das Angiotensin-Converting-Enzym dessen Abbau. Ein erhöhter Bradykininspiegel führt zu einer Erniedrigung des Gefäßwiderstands in der Lunge und erleichtert den Bluteinstrom in die Lunge. Die Befunde von SCHMIDT zeigten, daß dieser Mechanismus durch L-Thyroxin beschleunigt und durch Thioharnstoff verzögert wird. Dies führte zur Annahme, daß die Wirkung des Schilddrüsenhormons auf den Schlupf über die Regulierung der Bradykininbildung, welche die Lungenentwicklung beeinflusst, abläuft. Neben der Lungenatmung hat auch die Resorption des Dotters und die Retraktion des Dottersacks in die Bauchhöhle sowie die Ausbildung des Schlupfmuskels für den Schlupf eine wichtige Bedeutung. Bereits GROSSWICZ (1946) beobachtete, daß die Retraktion des Dottersackes bei hoher Thioharnstoffdosierung verzögert bzw. verhindert wird. WEISS (1979) folgerte aus dem vermehrten Gehalt von Dotterlipiden in der Leber gegen Ende der Inkubation nach Applikation von

L-Thyroxin, daß dieses die Resorption des Dotters beschleunigt.

Wie BRANDSTETTER (1962) feststellte, wird die Entwicklung des Schlupfmuskels durch die Schilddrüsenhormone beschleunigt.

Die Zunahme des Embryogewichts und der einzelnen Organe steht gleichfalls unter dem Einfluß von Thioharnstoff und L-Thyroxin. BEYER (1962) beobachtete bei einer Applikation von 0,0025mg L-Thyroxin kurz vor Beginn der Inkubation bereits am 4.Tag der Entwicklung ein erhöhtes Feucht- und Trockengewicht des Embryos, wobei auch der O_2 -Verbrauch entsprechend zunahm.

Im Gegensatz dazu wird nach Gabe von Thioharnstoff ein verringertes Wachstum des Embryos und seiner Organe beobachtet. Bei Schilddrüse, Nebenniere und Hoden hingegen zeigte sich eine deutliche Größenzunahme (ROMANOFF and LAUFFER, 1956). Für die Stärke des Effekts ist der Applikationszeitpunkt von ausschlaggebender Bedeutung. Die Hypertrophie der Schilddrüse ist eine Bestätigung für den thyreostatischen Effekt des Thioharnstoffs.

Neben dem Organwachstum wird auch der Stoffwechsel der Organe generell entsprechend von Thioharnstoff und L-Thyroxin beeinflusst. Während Thioharnstoff die Abnahme des ATP- und Glycogengehalts in der Leber sowie den Lipideinbau verzögerte, beschleunigte Thyroxin die Abnahme des ATP- und Glycogengehalts in diesem Organ und führt zu einer erhöhten cAMP-Konzentration (WITTMANN, 1978; WEISS, 1979).

Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der Xanthindehydrogenase nach Behandlung mit L-Thyroxin in geringem Ausmaß, und mit Thioharnstoff deutlich erhöht.

Bisher konnte nicht definitiv geklärt werden, wie die Wirkung von L-Thyroxin auf den Schlupf zustandekommt.

Im wesentlichen unterscheidet man bei den Schilddrüsenhormonen zwei Wirkungsmechanismen. Zum einen führen sie, in hoher Konzentration verabreicht, zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der stoffwechselaktiven Organe, die auf

einer Beeinflussung der Atmungskette beruht.

Geringe Mengen der Schilddrüsenhormone haben dagegen einen anabolen Effekt, der sich in einer Beschleunigung der Proteinsynthese manifestiert. Es gibt Hinweise dafür, daß nukleare und cytosolische Rezeptorproteine mit hoher Spezifität, hoher Affinität und geringer Bindungskapazität für die Schilddrüsenhormone existieren (OPPENHEIMER, et al., 1979).

Nach FISCHER et al., 1982) ist der dabei ablaufende Mechanismus dem der Steroidhormone ähnlich. Der Hormon-Rezeptor-Komplex gelangt in den Zellkern, wo er spezifisch auf die Nukleinsäuresynthese wirkt. Die anregende Wirkung der Schilddrüsenhormone auf Wachstum und Differenzierung läßt sich durch einen gesteigerten Nukleinsäurestoffwechsel erklären. Die Verabreichung von exogenem L-Thyroxin an Kaulquappen führte zu einem vermehrten Einbau von Thymidin in die DNA und einem verstärkten Einbau von Leucin in das Protein der Organe (SMITH-GILL and CAVER, 1981).

Nach OPPENHEIMER (1979) führt die Interaktion der Schilddrüsenhormone mit den entsprechenden Rezeptoren generell zu einem Anstieg der messenger-RNA-Produktion und zu einer Zunahme spezieller messenger-RNA-Sequenzen, welche diejenigen Proteine codieren, welche durch die Schilddrüsenhormone stimuliert werden. Studien an GH₁-Zellkulturen zeigten, daß eine direkte Korrelation zwischen der Bindung von Thyroxinanaloga und der Syntheserate des Wachstumshormons besteht (SAMUELS et al., 1977). Die unterschiedliche Ansprechbarkeit der einzelnen Organe auf die Schilddrüsenhormone erklären OPPENHEIMER et al. (1979) durch die variierende Verteilung der Rezeptoren.

Thioharnstoff entfaltet seine hemmende Wirkung auf den Schlupf und die Entwicklung als Thyreostatikum durch ein Absenken des Thyroxin-Plasmaspiegels. So stellten THOMMES und TONETTA (1979) nach Applikation von Thioharnstoff am 6. Tag der Inkubation fest, daß die Plasma-Thyroxinkonzentration ab dem 8. Tag signifikant abnimmt. BAST (1987) könnte

diese Ergebnisse bei Applikation des Thioharnstoffs am 10. Bebrütungstag bestätigen. WENDHORTH und RINGER (1986) erwähnen auch eine hemmende Wirkung der Goitrogene Thioharnstoff und Methimidazol auf die periphere Dejodierung von L-Thyroxin.

1.5 Zur Wirkung von Cycloheximid

Cycloheximid gehört zur Gruppe der Glutarimid-Antibiotika. Die Substanz wurde erstmals 1947 aus einem Kulturmedium von *Streptomyces griseus* isoliert (LEACH et al., 1947). Das Wirkungsspektrum umfaßt Hefen, eine Reihe phytopathogener, jedoch kaum humanpathogener Pilze sowie Protozoen, Algen und einige Viren. Die fungistatische Wirkung ist dominierend (BRUNNER und MACHEK, 1965).

Eine Anwendung in der Medizin hat sich nicht bewährt, da zum einen das Wirkungsspektrum sehr begrenzt ist, und zum anderen starke toxische Eigenschaften dagegen sprechen. Die Substanz wird heute nur noch zu experimentellen Zwecken und im Pflanzenschutz eingesetzt.

Cycloheximid ist insbesondere für seine hemmende Wirkung auf die Proteinsynthese bekannt. KERRIDGE (1958) zeigte, daß Cycloheximid ein potenter Inhibitor der Proteinsynthese in Zellen von *Saccharomyces carlsbergensis* ist. Eine Reihe weiterer Studien an anderen Untersuchungsmaterialien ergaben ähnliche Resultate.

Selbst die Antikörperbildung bei Mäusen (COONEY and BRADLEY, 1963), die Proteinbiosynthese und die Östrogenansprechbarkeit des Uterus von Ratten (GORSKI and AXMANN, 1964) werden durch Cycloheximid beeinträchtigt. Über den Wirkungsmechanismus, der zur Hemmung der Proteinsynthese führt, gibt es eine Reihe von Vorstellungen. SIEGEL und SISLER (1963) stellten fest, daß Cycloheximid die Aufnahme von Aminosäuren in die Proteinbindung stört. Dabei wird die Übertragung von Aminosäuren von der Aminoacyl-s-RNA zum Protein als der entscheidende Angriffspunkt gesehen. WETTERSTEIN et al. (1964) zeigten, daß Cycloheximid den GTP-abhängigen

Abbau von Polyribosomen zu Monomeren in vivo behindert. COLOMBO (1965) nahm an, daß Cycloheximid einen Schritt in der Proteinbiosynthese behindert, der für die Bindung und den Transport der messenger-RNA an die Ribosomen verantwortlich ist.

TRAKATELLIS (1965) kam bei seinen Versuchen mit Mäuseleberzellen zu ähnlichen Resultaten. Sowohl der manipulierte Abbau als auch die Neusynthese von Polyribosomen können durch Cycloheximid deutlich verzögert werden. Auffällig war bei den meisten dieser Versuche, daß die Beeinträchtigung der Proteinsynthese in vivo wesentlich stärker ist als in vitro.

Es gibt auch Anhaltspunkte für einen Einfluß von Cycloheximid auf die DNA- und RNA-Synthese. Während bei der RNA-Synthese nur ein geringer Effekt gesehen wurde, konnte die DNA-Synthese bei *Saccharomyces carlsbergensis* und beim humanen Epidermalzellkarzinom in Kultur durch Cycloheximid deutlich vermindert werden (KERRIDGE, 1958; BENNETT et al., 1964).

Cycloheximid wirkt sich auch auf den Energiemetabolismus bzw. die Zellatmung aus. GARBER et al. (1973) stellten an Ratten- und Schweineleberzellen fest, daß durch Cycloheximid die mitochondriale Respirationsrate vermindert wird. Daß Cycloheximid generell wachstumshemmend wirken kann, geht aus den Untersuchungen von PRUY (1982) und FREMMER (1984) hervor. PRUY fand bei Applikation des Thioharnstoffs am 17. Tag ein verringertes Schlupfgewicht und einen um ca. einen Tag verzögerten Schlupf bei Hühnerküken.

Bei den Untersuchungen von FREMMER an Hühnerembryonen ergab sich nach Applikation von Cycloheximid vor Beginn der Inkubation eine verminderte Gewichtszunahme der Embryonen.

2 Zielsetzung

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, inwieweit in den einzelnen Kompartimenten des Bruteis bzw. des Embryos überhaupt Pteridine vorkommen und um welche Pteridine es sich gegebenenfalls dabei handelt. Dazu wurden Eiklar, Eidotter, subembryonale Flüssigkeit, Allantoisflüssigkeit, Amnionflüssigkeit und embryonale Leber und Niere in jeweils geeigneten Entwicklungsphasen auf Pteridine untersucht.

Im zweiten Abschnitt sollte festgestellt werden, inwieweit Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid den Pteridin-stoffwechsel und die Pteridinverteilung beeinflussen.

L-Thyroxin und Thioharnstoff wurden eingesetzt, da sie bekanntlich beschleunigend bzw. hemmend in die Entwicklung des Vogelembryos eingreifen. Damit war die Möglichkeit gegeben, eventuelle Funktionen der Pteridine im Entwicklungs-geschehen zu verdeutlichen.

Mit Cycloheximid, das hemmend auf die Proteinsynthese wirkt, sollte die Auswirkung eines gestörten Proteinstoff-wechsels untersucht werden.

Die Substanzen wurden am 10. Tag appliziert. Nach diesem Zeitpunkt war eine genügende Menge an Allantoisflüssigkeit vorhanden.

Ergänzend zu den Untersuchungen über die Einwirkung der eingesetzten Substanzen auf das Pteridinmuster wurden auch allgemeine Entwicklungsparameter, wie das Feuchtge-wicht von Embryo und Organen, das Volumen von Allantois, Amnion, Dotter, subembryonaler Flüssigkeit und Eiklar, sowie der Proteingehalt der Organe untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Bruteier

Die Experimente wurden mit LSL-Bruteiern (Gut Heinrichsruh) der Rasse Weißes Leghorn durchgeführt. Die Bebrütung erfolgte in einem institutseigenen Brutschrank mit Wendeautomatik bei einer Temperatur von $37,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 5\%$.

3.2 Reagentien

Dowex-50W-Kationenaustauscherharz	Sigma/München
Pteridine (Reinsubstanzen):	Dr.B.Schircks Lab.
D-Neopterin	Wettswil/Schweiz
L-Biopterin	
Pterin	
Isoxanthopterin	
Creatinin-Testkombination	Boehringer/Mannheim
Protein-Assay	Biorad/München
Methylenblau	Merck/Darmstadt
Kükenalbumin	Sigma/München
Thioharnstoff	Merck/Darmstadt
L-Thyroxin	Henning/Berlin
Cycloheximid	Boehringer/Mannheim

Für sämtliche Phasen der Pteridinaufarbeitung wurde Wasser von Milipore-Qualität (Waters) verwendet. Die dabei eingesetzten Chemikalien (Merck/Mannheim) waren suprapur.

3.3 Applikation der Substanzen

Die Applikation der Substanzen erfolgte direkt in die Luftkammer. Diese Methode wird häufig praktiziert. Der Vorteil dieser Applikationsform besteht darin, daß die injizierten Substanzen innerhalb weniger Stunden durch

die Eihaut diffundieren und vom Embryo aufgenommen werden (KAICK und KRÜTTLER, 1968). Zudem ist die Methode einfach in der Handhabung. Die Gefahr einer Beeinträchtigung der Entwicklung durch ein Verletzen der inneren Eihaut ist gering.

Thioharnstoff und Cycloheximid wurden in H_2O bidest. gelöst. Da L-Thyroxin sich nur im Alkalischen gut löst, wurde es in verdünnter NaOH (pH = 9) aufgenommen.

Die gelösten Substanzen wurden am 10. Tag der Inkubation mit einer Tuberkulinspritze durch ein vorgebohrtes Loch in die Luftkammer appliziert. Das Loch wurde anschließend mit Klebstoff verschlossen. Um eine optimale Resorption zu gewährleisten, wurden die Eier die ersten 4 Stunden im Brüter mit der Luftkammer nach oben gelagert. Danach wurden sie wieder in die übliche waagrechte Lage verbracht.

Da über die Applikation von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid am 10. Tag kaum Erfahrungen vorlagen, mußte die Wirkung verschiedener Konzentrationen in einem Vorversuch erprobt werden. Anhaltspunkte für die eingesetzten Konzentrationen lieferten die Befunde von GROSSOWICZ (1946), ROMANOFF und LAUFFER (1956), BEYER (1962), BALABAN und HILL (1963), WEISS (1979) und FREMMER (1984).

Näheres zu den erprobten und schließlich eingesetzten Konzentrationen ist in Abschnitt 4.8.1. aufgeführt.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Applikation des Lösungsmittels alleine keinen Effekt auf den Embryo zeigte, wurde in den weiteren Versuchen auf die Injektion einer Kontrolllösung verzichtet.

3.4 Probengewinnung

Die Entnahme der Proben wurde wegen der Photolabilität der Pteridine bei reduzierter Lichtstärke durchgeführt.

Das Eiklar wurde vor der Bebrütung und am 3., 5., 8. und 10. Tag der Inkubation entnommen. Die dickflüssige und die dünn-

flüssige Eiklarfraktion wurden dabei voneinander getrennt.

Der Eidotter wurde gleichfalls in den entsprechenden Zeitintervallen mitsamt der Dottersackmembran entnommen.

Die subembryonale Flüssigkeit wurde nach dem Abtragen der Schale über der Luftkammer und der Eröffnung des Dottersackes abgegossen. Allerdings mußte dabei vorher die Allantoisflüssigkeit entfernt werden.

Die Gewinnung der Allantoisflüssigkeit erfolgte durch Absaugen mit einer Einwegspritze nach vorheriger Freilegung der Luftkammer. Dazu wurde die innere Eihaut durchstoßen. Es wurde Wert darauf gelegt, daß die Gefäße der Chorioallantoismembran nicht verletzt wurden, um Fehler bei der Pteridinbestimmung durch eine Verunreinigung der Allantoisflüssigkeit mit Blut zu vermeiden. Die Probenentnahme erfolgte täglich vom 10. bis zum 16. Tag der Inkubation. Dieser Zeitraum war durch den Applikationszeitpunkt und das vorhandene Flüssigkeitsvolumen vorgegeben.

Die Amnionflüssigkeit wurde im gleichen Inkubationszeitraum auf die gleiche Weise gewonnen. Dabei mußte zuvor allerdings die Allantoisflüssigkeit entfernt und der Einhalt aus der Schale entnommen werden.

Vor der Organentnahme wurde der Embryo durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde zunächst die Leber ohne Gallenblase und dann die Niere entnommen. Die Organentnahme erfolgte vom 10. bis zum 16. Tag, sowie am 18., 22. (Schlupf) und 24. Tag (Thioharnstoff). Bei der Niere wurde am 10. und 11. Tag wegen der geringen Größe und der weichen Konsistenz des Organs auf eine Entnahme verzichtet. Die frisch gewonnenen Proben wurden tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt.

3.5 Aufarbeitung der Proben

Im folgenden soll der Aufarbeitungsvorgang, modifiziert nach FUKUSHIMA und NIXON (1980) und STEA et al. (1980), kurz beschrieben werden.

Die gesamte Aufarbeitung wurde wegen der Photolabilität der Pteridine bei Rotlicht durchgeführt.

Da die eingesetzte Bestimmungsmethode auf der Fluoreszenzdetektion beruht, mußten die nicht fluoreszierenden Dihydro- und Tetrahydropteridinderivate erst in die fluoreszierende oxidierte Form übergeführt werden. Auf Grund der Befunde von FUKUSHIMA und NIXON (1980), daß Tetrahydrobiopterin nur im sauren Milieu vollständig in Biopterin übergeführt wird, während es im Alkalischen zu 80% in Pterin umgewandelt wird, erfolgte die Oxidation bei der Aufarbeitung im sauren Milieu.

Zu dieser ersten Aufarbeitungsphase wurde 1ml der Probe mit 300µl HCL (1 mol/l) auf pH 1 gebracht. Zur Oxidation wurden anschließend 200µl einer KJ/J₂-Lösung (1% KJ, 0,5% J₂ in 0,1 molarer HCL) zugegeben, und das Gemisch 1 Stunde bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wurde das überschüssige Jod durch Zugabe von 200µl L(+)-Ascorbinsäure in 1%-iger Lösung reduziert, und eventuell in der Probe befindliches Protein durch die Zugabe von 35µl Trichloressigsäure (5 mol/l) ausgefällt. Der Überschuß der zugegebenen Jodlösung und die Entfernung des restlichen Jods durch die Ascorbinsäure wurde mit dem Stärketest (Tüpfelprobe) überprüft.

Das durch die Trichloressigsäure ausgefällte Protein wurde anschließend abzentrifugiert (15 min bei 6000 U/min).

Zur Abtrennung hochmolekularer Stoffe und anderer fluoreszierender Substanzen, die die Pteridinbestimmung beeinträchtigen könnten, wurde der Überstand in der 2. Aufarbeitungsphase auf eine mit Dowex-Kationenaustauscherharz bepakte Glassäule gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen.

Dann wurde die Säule mit 16ml H₂O (Milipore) nachgewaschen.

In diesem Eluat können sich Isoxanthopterin und die Lumazine befinden.

Im 2.Durchgang wurde die Säule mit 6 ml einer NH_4OH -Lösung (1 mol/l, pH = 9) gewaschen. In diesem Eluat befinden sich die Übrigen zu bestimmenden Pteridine.

Wegen der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz und aus technischen Gründen (Unverträglichkeit von Lösungsmitteln mit einem pH von über 9,0 für die HPLC-Anlage) wurde dieses Eluat mit ca. 400 μl Eisessig auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Beide Eluate wurden in tiefgefrorenem Zustand bei -20°C in Eppendorf-Probengefäßen aufbewahrt.

Auf die eben beschriebene Weise wurden Allantois-, Amnion-, und Subembryonalflüssigkeit aufgearbeitet. Für die Organproben und den Dotter wurde eine abgeänderte, ebenfalls von FUKUSHIMA und NIXON (1980) beschriebene Methode der Aufarbeitung angewendet.

Die aufgetauten Organproben wurden mit dem 10-fachen Volumen Phosphorsäure (0,833 mol/l) im Potter-Homogenisator homogenisiert (1300 U/min, 3 - 5 Schläge). 1ml des Homogenats wurde mit 100 μl KJ/J_2 -Lösung (1% KJ , 0,5% J_2 in 0,2 molarer Trichloressigsäure) versetzt. Dann wurde die Probe, wie oben beschrieben, weiterverarbeitet. Bei einem Organgewicht unter 100mg wurden Sammelproben von 2 bis 5 Organen aufgearbeitet.

Bei der Aufarbeitung des Dotters und des Eiklars wurde im Prinzip genauso wie bei den Organen verfahren, allerdings mit dem Unterschied, daß 1ml der Probe nur mit der 2-fachen Menge an Phosphorsäure versetzt wurde.

3.6 Pteridinbestimmung

Die Auftrennung der Pteridine erfolgte mittels der reversed-phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

und ihre quantitative Bestimmung mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion.

Die von den Reinsubstanzen hergestellten Standardpteridinlösungen dienten dabei zur Identifizierung und zur Berechnung der Pteridinkonzentration in den Proben.

Die Wiederfindung für Standardsubstanz und Probe/Standardgemische nach Aufarbeitung lag für die untersuchten Pteridine bei ca. 95%. Das entspricht, berücksichtigt man die in den Probengläsern zurückbleibenden Flüssigkeitsreste, einer nahezu vollständigen Wiederfindung.

Die Nachweisgrenze ist bei ca. 0,5ng/ml für Neopterin, Biopterin und Pterin und bei ca. 0,1ng/ml für Isoxanthopterin anzusetzen (bezogen auf 1 ml Probe vor der Aufarbeitung). Für die Analyse wurde ein Volumen von ca. 300 µl benötigt. Davon werden exakt 100µl über die Probenschleife in die Meßapparatur injiziert.

An dieser Stelle sollen die verwendeten Gerätschaften kurz beschrieben werden.

HPLC - Pumpe	Biotronik 3020 T
Flußrate	1 ml/min
Injektionssystem	Biotronik Deripas Sample Injektor
Probenschleife	100 µl
Säule	Grom Metallsäule 500 x 4,6 mm
Vorsäule	Kartuschenvorsäule 20 x 4,6 mm
Säulenfüllung	Spherisorb ODS 2 5µ
Detektor	Fluoreszenzdetektor Shimadzu RF 530
Wellenlänge Excitation	350nm
Wellenlänge Emission	450nm
Laufmittel	Gemisch aus 0,2% Phosphorsäure(85%-ig), 1% Acetonitril, 7% Methanol und Wasser (pH = 2,7)

3.7

Creatininbestimmung

Zur Creatininbestimmung wurde die Methode nach JAFFE (1886)

mit Enteiweißung, modifiziert nach SEELIG und WÜST (1969), verwendet. Sie beruht auf dem Prinzip, daß Creatinin mit Pikrat im Alkalischen einen farbigen Komplex bildet. Für die Bestimmung wurde die Farb-Testkombination von Boehringer/Mannheim verwendet. Creatininbestimmungen wurden in Allantois- und Amnionflüssigkeit gemacht. Generell wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Konzentrationsbereich in der Allantoisflüssigkeit ist etwa mit dem im Serum vergleichbar. Das bedeutet, daß keine Vorverdünnung wie beim Urin nötig war. In der Amnionflüssigkeit war mit der beschriebenen Methode kein Creatinin nachweisbar.

3.8 Proteinbestimmung

In der embryonalen Leber und Niere wurde der Gehalt an löslichem Protein bestimmt. Hierfür wurde die Methode nach BRADFORD (1976) eingesetzt. Der Test beruht auf der Tatsache, daß in Anwesenheit von Protein das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillantblau G-250 von 465 auf 595nm ansteigt.

Zur Bestimmung wurden 100µl des Homogenats der Organproben vor der Zugabe des Farbstoffs 1:10 vorverdünnt. Die quantitative Auswertung der mit dem Photometer bestimmten Extinktionswerte erfolgte an Hand einer Eichkurve, die mit gereinigtem Hühneralbumin als Standard hergestellt worden war.

3.9 Volumenbestimmungen

Die Volumenbestimmungen der Allantois- und Amnionflüssigkeit sowie von Dotter, Eiklar und subembryonaler Flüssigkeit erfolgten mittels eines geeichten Meßzylinders mit einer Skaleneinteilung von 0,1 ml.

Das Volumen der Allantoisflüssigkeit wurde außerdem mit einer Farbstoffverdünnungsmethode ermittelt. Hierfür wurde

eine Methylenblaulösung mit einem Extinktionsgrad von 0,8 bei einer Wellenlänge von 546 nm verwendet. Dann wurde eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:15 angefertigt und daraus eine Eichkurve erstellt.

100µl der angegebenen Standardlösung wurden mit einer Tuberkulinspritze in die Allantois appliziert, und anschließend die Eier im Wasserbad bei 37,5°C 30min lang geschüttelt, um eine gute Durchmischung des Farbstoffs mit der Allantoisflüssigkeit zu erreichen. Danach wurde 1ml der Allantoisflüssigkeit entnommen und die Extinktion bestimmt. An Hand der Eichkurve wurde dann das Volumen berechnet. Diese Methode war jedoch nur bis zum 13. Bebrütungstag anwendbar, da ab dem 14. Tag eine starke Eintrübung der Allantoisflüssigkeit eine exakte Messung unmöglich machte.

3.10 Gewichtsbestimmungen

Die Bruteier wurden vor der Probenentnahme gewogen. Feuchtgewichtsbestimmungen wurden am Embryo (ohne Dottersack), an der Leber (ohne Gallenblase) und an der Niere durchgeführt.

3.11 Statistische Berechnungen

Die in den Tabellen angegebenen Werte sind, falls nicht anders vermerkt, arithmetische Mittelwerte. Dazu wurde jeweils die Standardabweichung angegeben.

Mit Hilfe des parameterfreien U-Tests nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (SACHS, 1972) wurde die Signifikanz errechnet. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern (n) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Pteridinbestimmung im Eiklar

Im Eiklar wurden Untersuchungen vor der Bebrütung und am 3., 5., 8. und 10. Tag der Inkubation durchgeführt. Dabei konnten weder in der dünnflüssigen, noch in der dickflüssigen Eiklarfraktion Pteridine gefunden werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 ng/ml für Neopterin, Biopterin und Pterin und 0,1 ng/ml für Isoxanthopterin.

4.2 Pteridinbestimmung im Eidotter

Der Eidotter wurde ebenfalls vor der Bebrütung und am 3., 5., 8. und 10. Tag der Entwicklung untersucht (Abb. 1). Im unbebrüteten Ei wurden nur Biopterin und Pterin nachgewiesen. Der Biopteringehalt blieb bis zum 5. Tag auf einem konstant niedrigem Niveau und stieg dann bis zum 10. Tag auf das 4-fache an. Pterin zeigte einen ähnlichen Verlauf. Allerdings setzte der steile Anstieg bereits nach dem 3. Tag ein. Außerdem war der Pteringehalt im Dotter stets höher als der Biopteringehalt. Isoxanthopterin konnte frühestens am 5. Tag der Inkubation nachgewiesen werden. Die Menge war jedoch sehr gering.

4.3 Pteridinbestimmung in der subembryonalen Flüssigkeit

Eine vollständige und saubere Gewinnung der subembryonalen Flüssigkeit war nur zwischen dem 5. und dem 10. Tag der Bebrütung möglich. Vor diesem Zeitpunkt ließ sich die subembryonale Flüssigkeit nur schwer vom Dotter abtrennen. Nach dem 10. Tag war der Großteil der Subembryonalflüssigkeit bereits wieder verschwunden. Wie Abb. 2 zeigt, stieg der Gehalt von Biopterin vom 5.

bis zum 10.Tag steil an, wobei auch hier der Pteringerhalt deutlich höher war als der Biopteringehalt. Ähnlich wie im Dotter war auch in der subembryonalen Flüssigkeit die Isoxanthopterinemenge am geringsten. Sie erhöhte sich vom 5. bis zum 8.Tag jedoch deutlich. Neopterin konnte erst am 10.Tag nachgewiesen werden.

4.4 Pteridinbestimmung in der Amnionflüssigkeit

Die Amnionflüssigkeit (Abb.3) enthielt ab dem 13.Tag Isoxanthopterin und Biopterin, jedoch kein Pterin. Der Biopteringehalt ist durch einen steilen Anstieg vom 13. bis zum 16.Tag gekennzeichnet. Isoxanthopterin erniedrigte sich mengenmäßig vom 13. bis zum 14.Tag. Die Isoxanthopterinemenge war deutlich niedriger als die Biopterinmenge.

4.5 Pteridinbestimmung in der Allantoisflüssigkeit

Im Vergleich zu den vorausgegangenen Untersuchungen fällt die hohe Isoxanthopterinemenge in der Allantoisflüssigkeit (Abb.4) auf. Sie stieg vom 10. bis zum 13. Tag konstant an und fiel dann vom 13. bis zum 14.Tag wieder stark ab. Demgegenüber nahm die ausgeschiedene Biopterinmenge vom 10. bis zum 16.Tag zu. Pterin erhöhte sich erst vom 14. bis zum 15.Tag deutlich. Im Gegensatz zu Dotter, Amnion, Leber und Niere konnte in der Allantoisflüssigkeit ab dem 12.Tag auch Neopterin nachgewiesen werden. Die ausgeschiedene Menge stieg vom 12. bis zum 16.Tag leicht aber stetig an. Bezieht man die ausgeschiedene Pteridinmenge auf den Creatiningehalt der Allantoisflüssigkeit (Abb.5), so veränderte sich der Verlauf des Biopterin-, Pterin- und Neopteringehalts nicht wesentlich, lediglich der Isoxanthopteringehalt erreichte bereits am 11.Tag sein Maximum, blieb bis zum 13.Tag in etwa gleich und fiel dann stark ab.

Abb. 1 : Der Pteridingehalt des Eidotters in der
1. Entwicklungshälfte

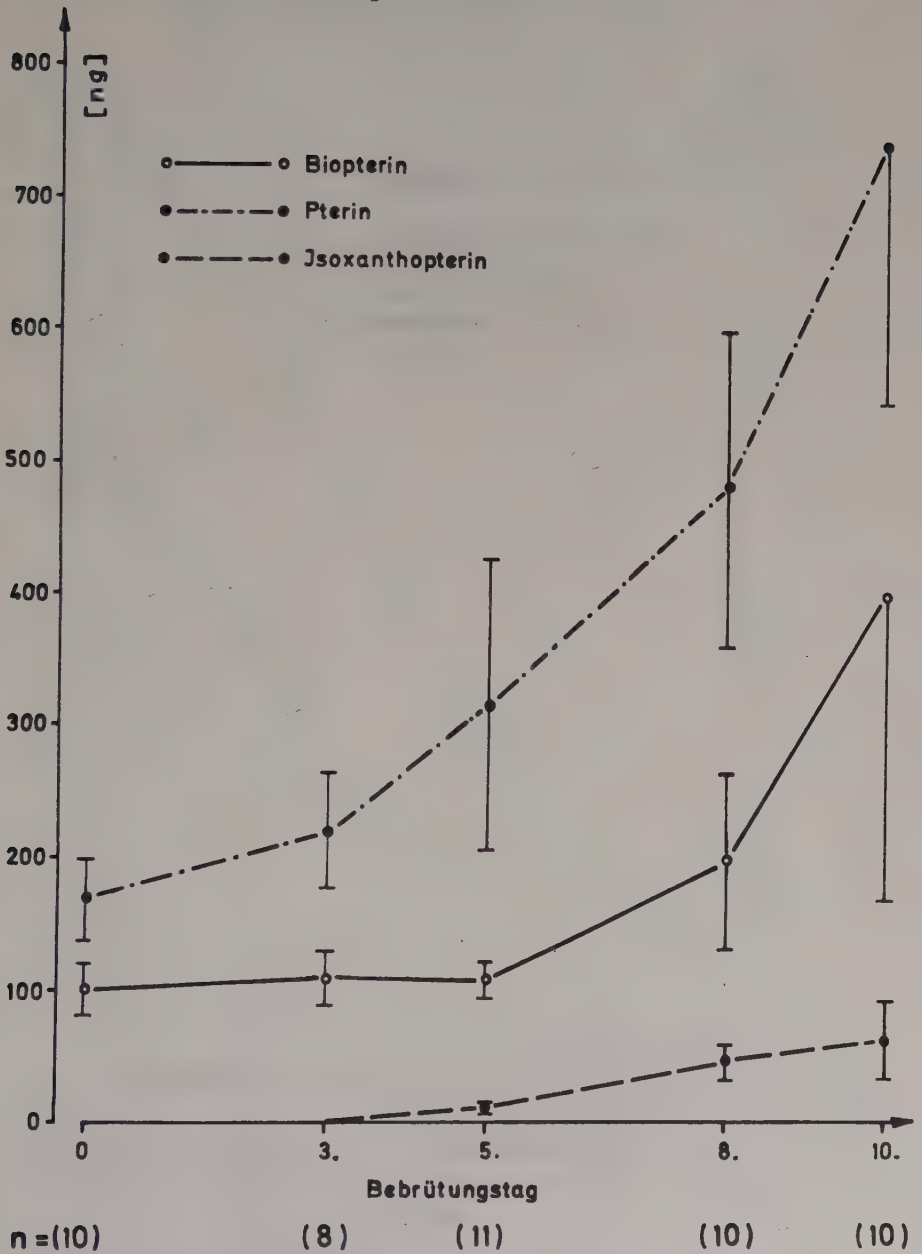


Abb. 2 : Der Pteridingehalt der subembryonalen Flüssigkeit
am 5., 8. und 10.Tag

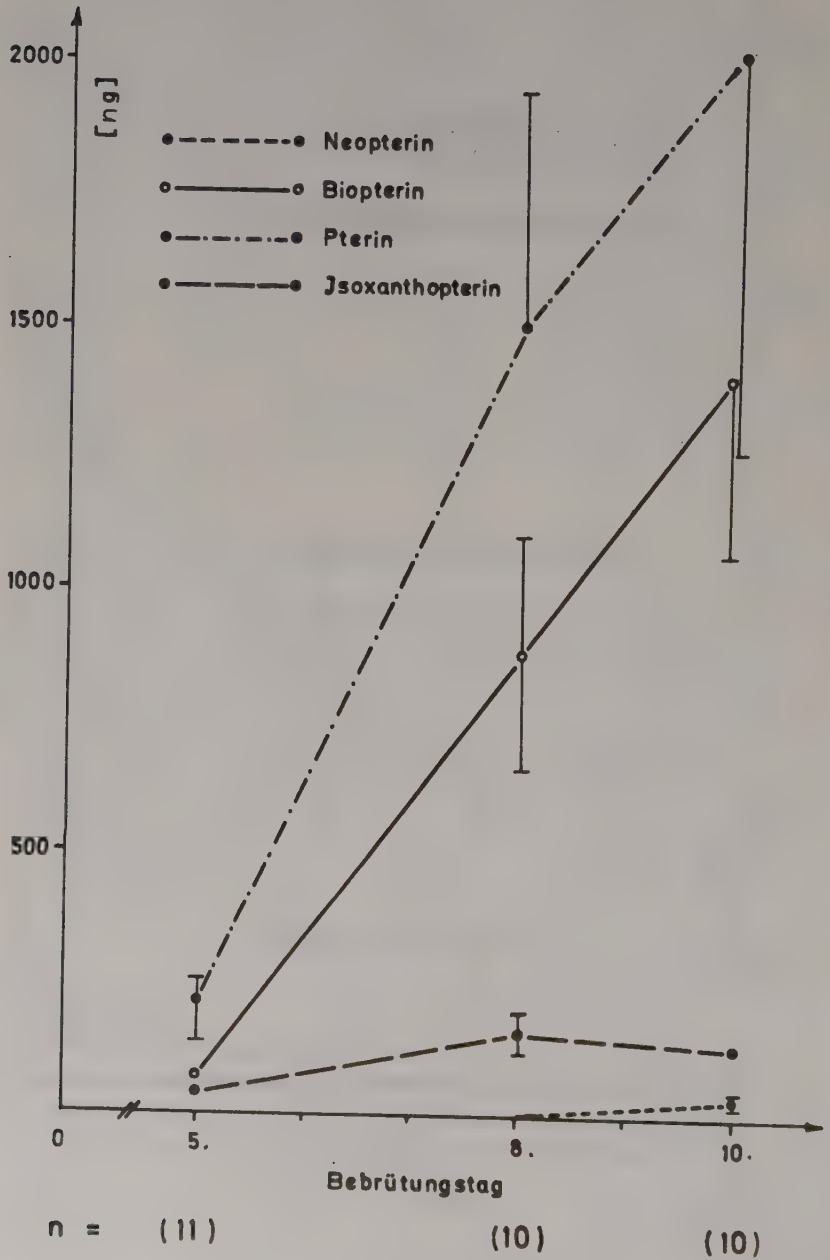


Abb. 3 : Der Pteridingehalt der Amnionflüssigkeit
vom 13. bis zum 16.Tag

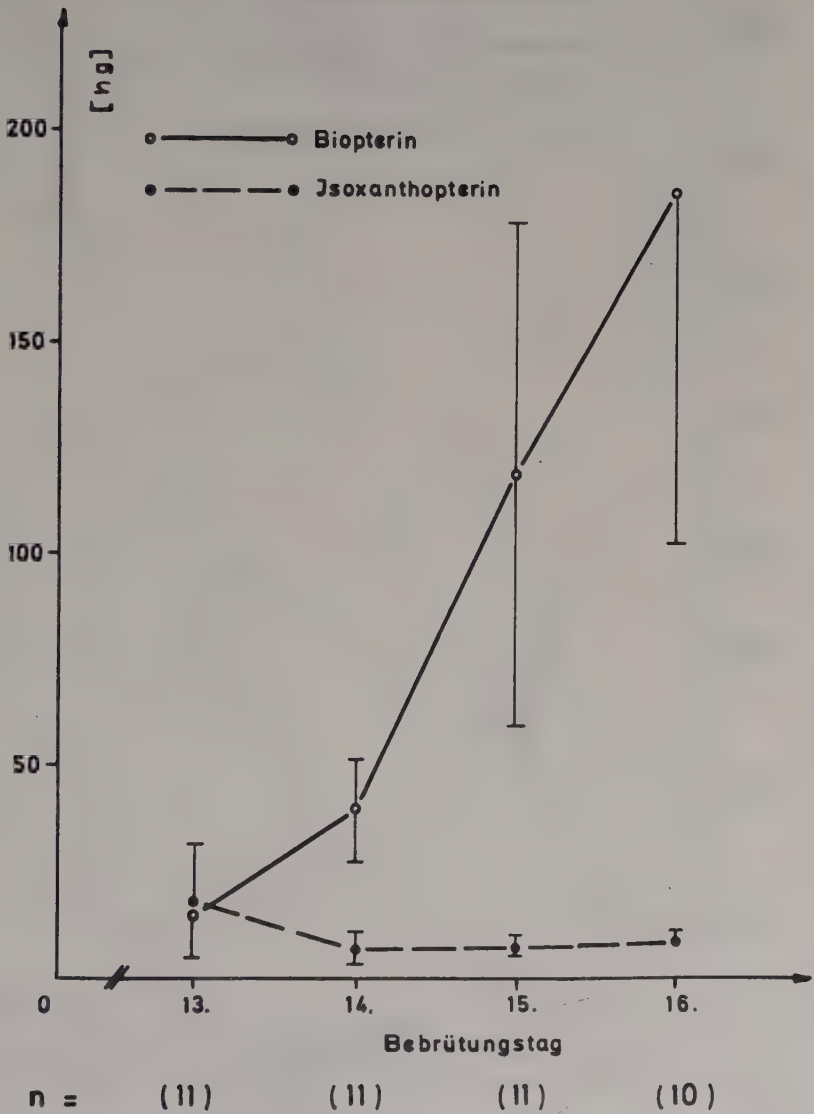


Abb. 4 : Der Pteridingehalt der Allantoisflüssigkeit vom 10. bis zum 16.Tag

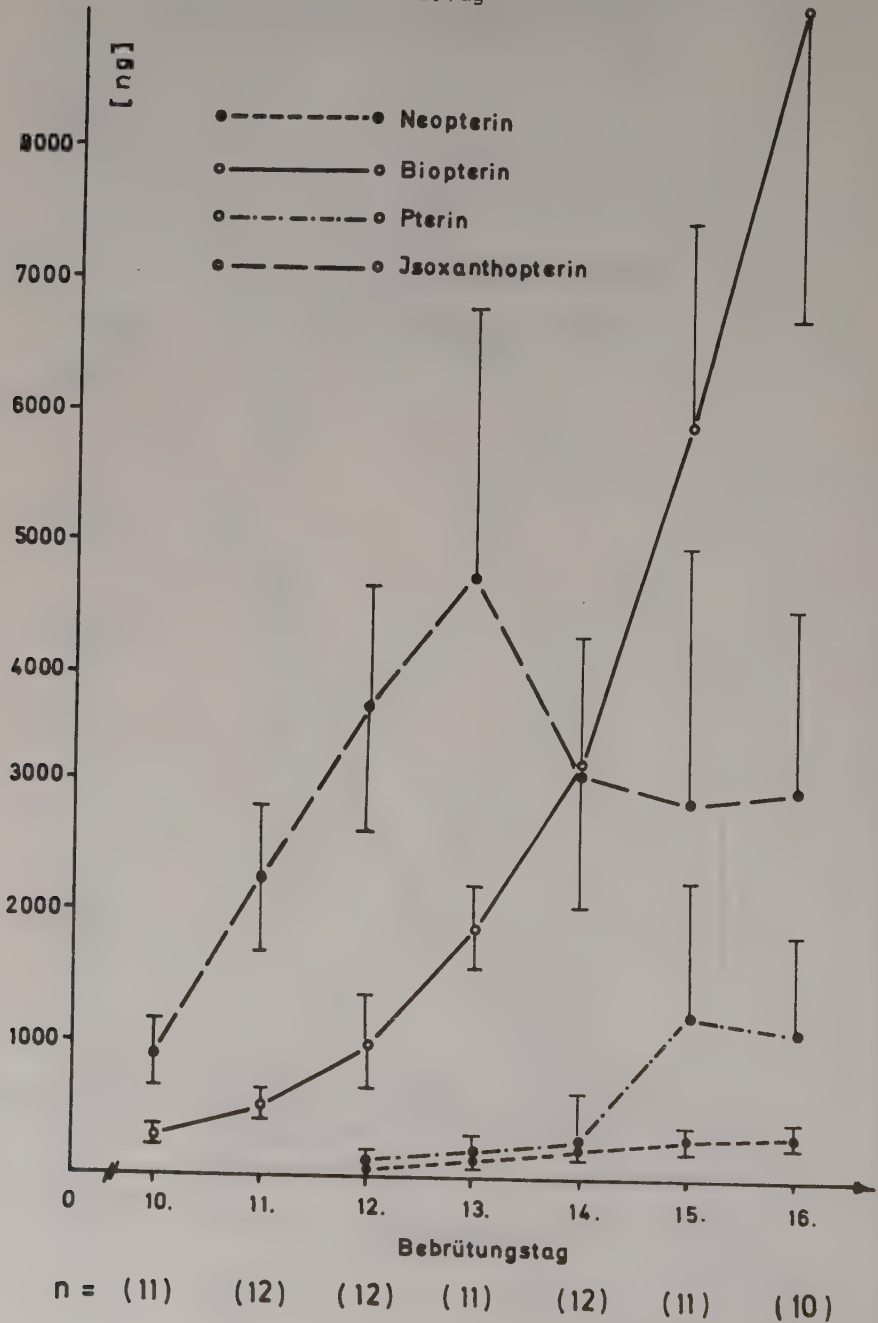
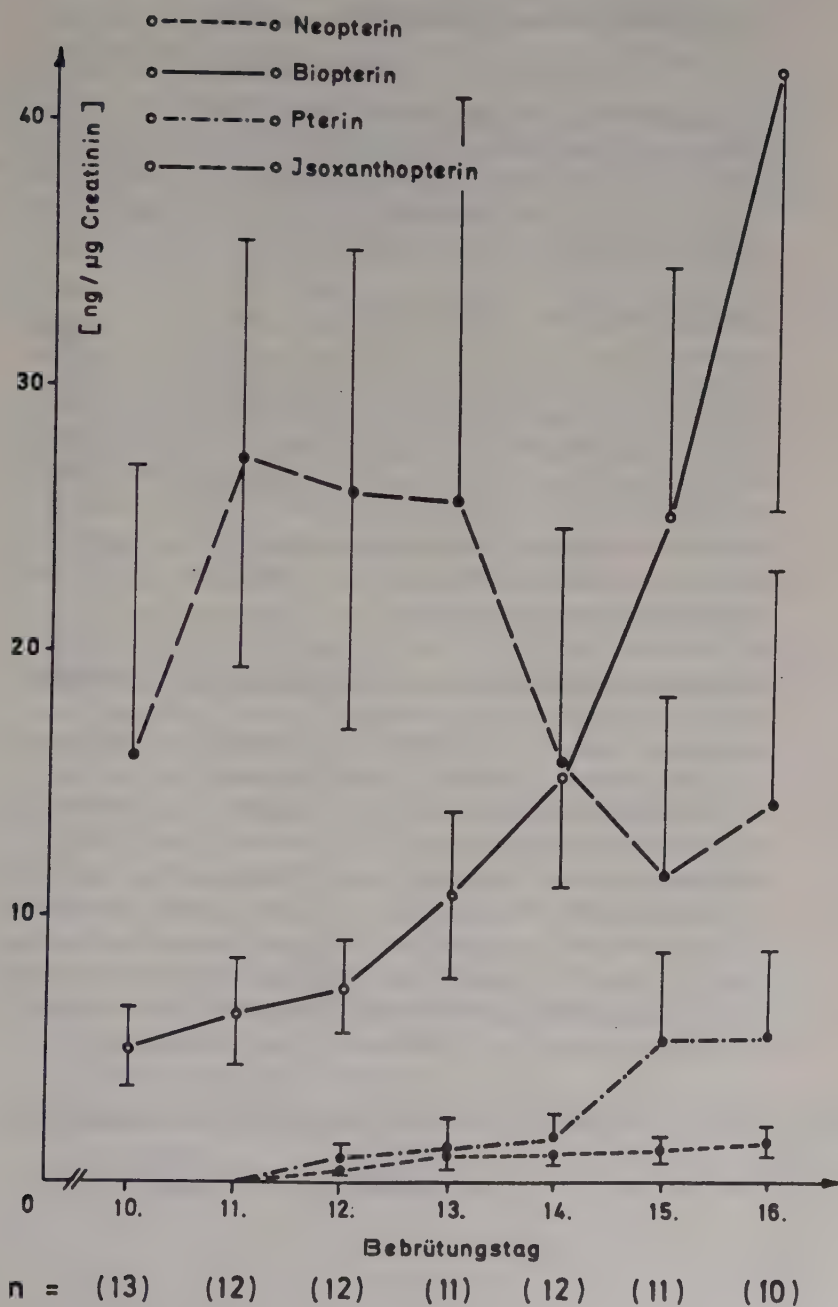


Abb. 5: Das Pteridin/Creatinin-Verhältnis in der Allantoisflüssigkeit



4.6 Pteridinbestimmung in der Leber

Auch in der Leber (Abb.6) konnten Biopterin, Pterin und Isoxanthopterin nachgewiesen werden. Während die Konzentration des Biopterins und des Pterins sich im letzten Drittel der Embryonalentwicklung deutlich erhöhte, blieb die Isoxanthopterinkonzentration vom 10. bis zum 22.Tag annähernd konstant. Sie war auffallend niedrig.

4.7 Pteridinbestimmung in der Niere

In der Niere (Abb.7) war, ebenso wie in der Leber, im letzten Drittel der Inkubation ein Anstieg der Biopterin- und Pterinkonzentration zu beobachten, wobei der Anstieg beim Biopterin zwischen 13. und 16.Tag besonders stark ausgeprägt war. Schließlich fiel auf, daß die Niere im Vergleich zur Leber eine bemerkenswert hohe Isoxanthopterinkonzentration aufwies. Diese stieg bis zum 16.Tag an und fiel dann wieder ab.

4.8 Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid

Um Versuche mit Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid durchführen zu können, mußte zunächst der Einfluß dieser Substanzen auf den Schlupfzeitpunkt und die Überlebensrate bestimmt werden.

Außerdem wurde die Wirkung dieser Substanzen an Hand einiger allgemeiner Parameter verfolgt. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß der Substanzen auf das Volumen der Amnion- und Allantoisflüssigkeit, das Embryogewicht, das Ei/Embryogewichtsverhältnis und das Feuchtgewicht und den Gehalt an löslichem Protein von Leber und Niere untersucht.

4.8.1 Einfluß auf den Schlupfzeitpunkt und die Überlebensrate

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, waren die Verluste nach

Applikation von Thioharnstoff bei allen eingesetzten Mengen zwischen dem 10. und dem 18.Tag sehr gering. Erst ab dem regulären Schlupfzeitpunkt zeigten sich Unterschiede in Abhängigkeit von der applizierten Menge.

Als Schlupfzeitpunkt wurde derjenige Tag der Inkubation angegeben, an dem mehr als die Hälfte der Küken zum Schlupf kamen. Während bei einer Dosis von 6,5 und 13 μmol Thioharnstoff pro Ei nahezu normale Schlupfergebnisse erzielt wurden, wurde der Schlupf ab einer Dosierung von 26 μmol verhindert. Mengen ab 39 μmol bewirkten eine deutliche Verlängerung der Überlebensdauer bis zum 28.Tag und in Einzelfällen noch länger. Bis zu einer Dosierung von 38 μmol wurde der Schlupf immerhin noch eingeleitet. Bei ca. 70% der mit dieser Menge behandelten Eier wurde die Schale bis zum 27.Tag angepickt. Bei einer Dosis von 62,5 μmol konnte kein Anpicken mehr beobachtet werden.

Die Gabe von L-Thyroxin (Tabelle 2) wirkte sich ab einer Menge von 1,4 nmol pro Ei zu 100% letal für den Embryo aus. Bei einer Dosierung von 0,7 nmol starb ein Großteil der Embryonen zwischen dem 10. und 14.Tag der Inkubation ab. Erst mit 0,35 und 0,17 nmol L-Thyroxin wurde eine Schlupfrate erreicht, welche annähernd der unbehandelten Eier gleichkam. Der Schlupfzeitpunkt wurde nicht beeinflusst.

Cycloheximid (Tabelle 3) verursachte bei einer Dosis von 10,5 μmol das Absterben sämtlicher behandelter Embryonen. Eine normale Schlupfrate wurde erst bei Dosierungen von 1,3 und 2,6 μmol pro Ei beobachtet. Charakteristisch für die Wirkung von Cycloheximid war, daß fast alle Verluste kurz nach der Behandlung auftraten. Der Schlupfzeitpunkt wurde durch Cycloheximid nicht beeinflusst.

Auf Grund dieser Befunde wurden für die weiteren Versuche folgende Dosierungen verwendet.

Thioharnstoff :	39,0 μmol
L-Thyroxin :	0,35 nmol
Cycloheximid :	2,6 μmol

Abb. 6 : Der Verlauf der Pteridinkonzentration in der Leber

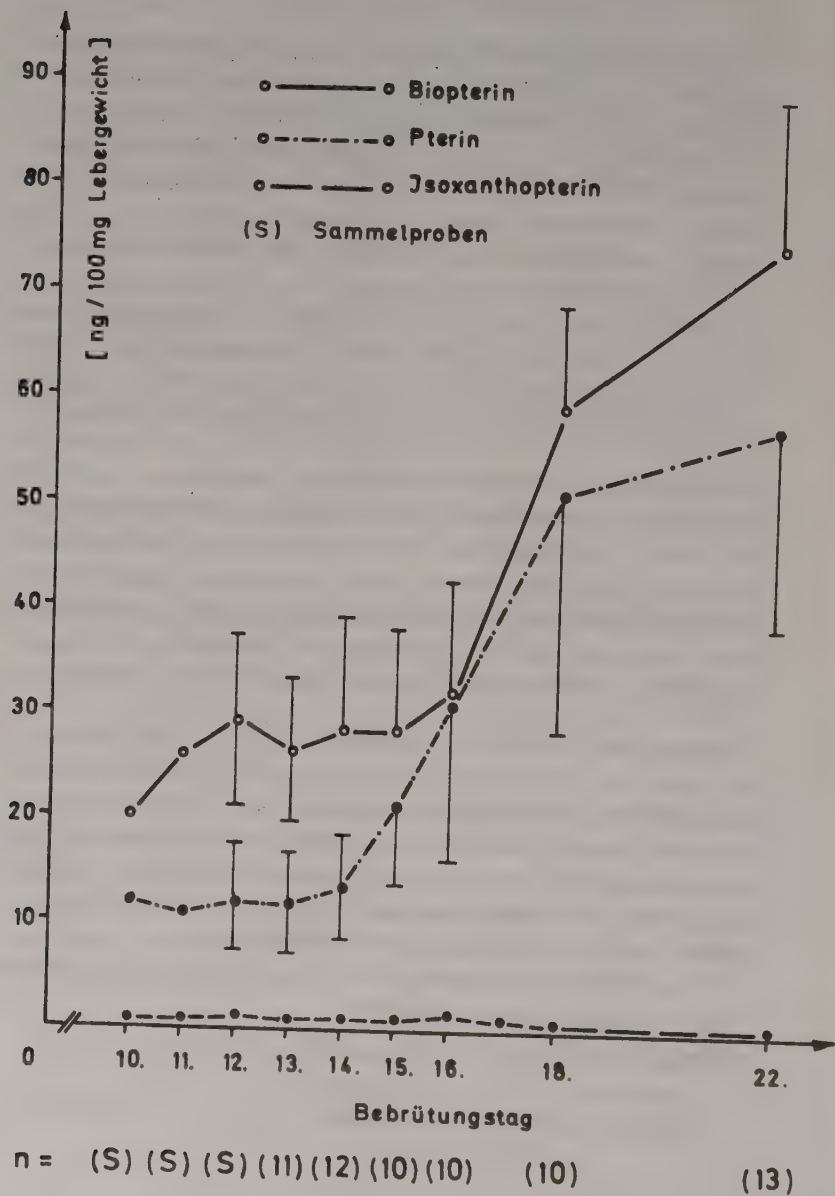
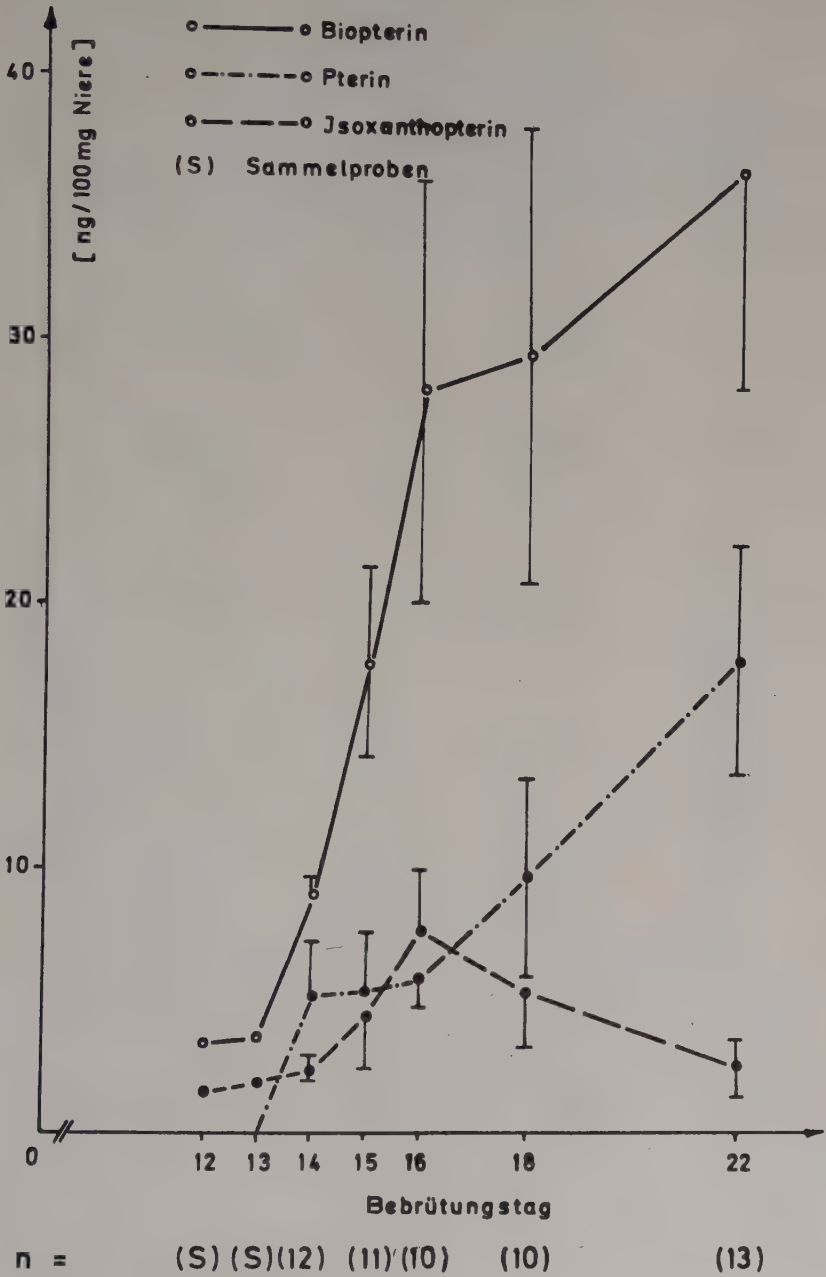


Abb. 7 : Verlauf der Pteridinkonzentration in der Niere



Tab. 1 : Einfluß von Thioharnstoff in verschiedenen Dosierungen auf die Schlupfrate und den Schlupfzeitpunkt

Thioharnstoff (μmol)	0	6,5	13,0	26,0	39,0	62,5
n	45	16	25	9	21	20
Verluste bis 14.Tag	2	0	1	0	0	1
Verluste 15. bis 18.Tag	2	1	1	0	1	1
Verluste gesamt	7	4	8	9	21	20
Schlupfrate (%)	84,5	75	68	0	0	0
Schlupfzeitpunkt (Tag)	22.	22.	22.	-	-	-
Überlebensdauer im Ei (Tag)	-	-	-	23.	27.	28.

Tab. 2 : Einfluß von L-Thyroxin in verschiedenen Dosierungen auf die Schlupf-
rate und den Schlupfzeitpunkt

L-Thyroxin (nmol)	0	0,17	0,35	0,7	1,4	2,8
n	45	20	40	36	32	40
Verluste bis 14.Tag	2	3	4	28	28	40
Verluste 15. bis 18.Tag	2	2	3	4	4	0
Verluste gesamt	7	6	10	32	32	40
Schlupfrate (%)	84,5	70	75	11	0	0
Schlupfzeitpunkt (Tag)	22.	22.	22.	22.	-	-

Tab. 3 : Einfluß von Cycloheximid in verschiedenen Dosierungen auf die Schlupfrate und den Schlupfzeitpunkt.

Cycloheximid (pmol)	0	1,3	2,6	5,2	7,9	10,5
n	45	20	40	22	9	12
Verluste bis 14.Tag	2	4	6	11	8	12
Verluste 15. bis 18.Tag	2	0	0	1	0	0
Verluste gesamt	7	4	8	12	8	12
Schlupfrate (%)	84,5	80	80	46	11	0
Schlupfzeitpunkt (Tag)	22.	22.	22.	22.	22.	-

4.8.2 Einfluß auf allgemeine Parameter

4.8.2.1 Einfluß auf Allantois- und Amnionvolumen

Wie Tabelle 4 bzw. 5 zu entnehmen ist, verursachten die verabreichten Substanzen im allgemeinen keine deutlichen Veränderungen. Lediglich am 15.Tag war unter dem Einfluß von L-Thyroxin das Allantoisvolumen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt.

4.8.2.2 Einfluß auf Embryogewicht und Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis

Die mit Thioharnstoff behandelten Eier zeigten bereits 2 Tage nach der Applikation ein im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhtes Ei/Embryo-Verhältnis (Tabelle 6). Die Tendenz setzte sich über die gesamte Inkubationsdauer hinweg fort. Der Effekt von Thioharnstoff war außerdem auch beim Feuchtgewicht des Embryo (Tabelle 7) festzustellen. Die mit Thioharnstoff behandelten Embryonen wiesen in der Regel ein geringeres Feuchtgewicht auf als die Kontrollen.

Demgegenüber war der Einfluß von L-Thyroxin auf das Ei/Embryoverhältnis (Tabelle 6) und auf das Embryogewicht (Tabelle 7) nicht so deutlich ausgeprägt. Ein signifikant erhöhtes Ei/Embryoverhältnis war bei L-Thyroxin nur am 13.Tag der Inkubation gegeben. Diese Embryonen zeichneten sich auch durch ein niedrigeres Feuchtgewicht aus.

Bei den mit Cycloheximid behandelten Embryonen war zwar ein im allgemeinen erhöhtes Ei/Embryo-Verhältnis angedeutet, die Unterschiede ließen sich jedoch nur am 12. und 13.Tag statistisch absichern. Das Embryofeuchtgewicht wies unter dem Einfluß von Cycloheximid keinen deutlichen Unterschied gegenüber den Kontrollen auf.

Tab. 4: Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Allantoisvolumen

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Allantoisvolumen in ml							
10	6,9 ±1,32	(13)	-		-		-	
11	8,7 ±1,13	(12)	10,3 ±1,06	(12)	9,5 ±1,91	(10)	9,2 ±0,64	(11)
12	10,5 ±1,07	(12)	10,2 ±1,56	(10)	11,0 ±1,70	(10)	10,3 ±1,23	(11)
13	11,3 ±1,34	(11)	11,5 ±1,41	(10)	10,6 ±1,11	(10)	11,7 ±1,43	(10)
14	11,1 ±1,49	(12)	11,2 ±1,47	(11)	9,8 ±1,82	(9)	10,5 ±1,71	(10)
15	10,6 ±1,81	(11)	10,7 ±1,44	(11)	8,3 ^{xxx} ±1,46	(8)	9,3 ±0,97	(9)
16	7,8 ±1,25	(10)	7,7 ±1,12	(10)	6,2 ±1,68	(9)	7,5 ±1,58	(10)

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 5: Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Amnionvolumen

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Amnionvolumen in ml							
13	4,25	(11)	3,56	(10)	3,66	(10)	3,96	(10)
	±1,03		±0,58		±0,93		±0,59	
14	3,81	(12)	3,22	(11)	3,71	(9)	3,48	(10)
	±0,77		±0,31		±1,02		±0,84	
15	4,03	(11)	4,33	(11)	3,99	(8)	4,01	(9)
	±0,52		±0,47		±0,61		±0,72	
16	3,92	(10)	3,75	(10)	3,73	(9)	4,32	(10)
	±0,13		±0,43		±0,89		±1,58	

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

Tab. 6 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Ei/Embryoverhältnis

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d								
10	22,91 2,73	(13)	-		-		-	
11	14,65 ±1,11	(12)	15,51 ±3,58	(12)	13,95 ±2,92	(10)	15,28 ±2,37	(11)
12	10,68 ±0,76	(12)	12,46 ^{xxx} ±1,08	(10)	10,79 ±1,41	(10)	11,80 ^{xx} ±0,79	(11)
13	7,69 ±0,27	(11)	8,57 ^{xxx} ±0,54	(10)	9,21 ^{xxx} ±0,88	(10)	8,67 ^{xxx} ±1,18	(10)
14	5,57 ±0,54	(12)	6,27 ^x ±0,42	(11)	5,59 ±0,52	(9)	5,78 ±0,61	(10)
15	4,17 ±0,37	(11)	4,46 ±0,34	(11)	4,22 ±0,58	(8)	4,04 ±0,23	(9)
16	2,13 ±0,14	(10)	2,87 ^{xxx} ±0,31	(10)	2,05 ±0,09	(9)	2,28 ±0,18	(10)
18	2,13 ±0,14	(10)	2,87 ^{xxx} ±0,31	(10)	2,05 ±0,09	(8)	2,28 ±0,18	(9)
22	-		2,39 ±0,09	(12)	-		-	
24	-		2,03 ±0,10	(10)	-		-	

x = $p \leq 0,05$

(n) = Anzahl der Proben

xx = $p \leq 0,01$

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 7 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Embryofeuchtgewicht

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Embryofeuchtgewicht in g							
10	2,34 ±0,26	(13)	-		-		-	
11	3,48 ±0,45	(12)	3,53 ±0,78	(12)	3,85 ±0,97	(10)	3,48 ±0,57	(11)
12	4,71 ±0,53	(12)	4,41 ±0,48	(10)	5,01 ±0,89	(10)	4,32 ±0,58	(11)
13	6,72 ±0,37	(11)	6,42 ±0,69	(10)	5,55 ^{xxx} ±0,29	(10)	6,08 ±0,66	(10)
14	9,76 ±0,96	(12)	8,23 ^{xxx} ±0,57	(11)	8,93 ±1,02	(9)	8,82 ±0,76	(10)
15	12,98 ±0,64	(11)	12,08 ±0,90	(11)	12,64 ±1,56	(8)	12,77 ±0,57	(9)
16	16,43 ±0,73	(10)	14,67 ^{xxx} ±0,81	(10)	15,25 ±2,22	(9)	15,23 ±2,83	(10)
18	23,29 ±1,41	(10)	18,33 ^{xxx} ±1,89	(10)	22,41 ±2,91	(8)	24,78 ±2,53	(9)
22	40,07 ±2,94	(13)	21,21 ^{xxx} ±1,07	(12)	38,27 ±1,91	(8)	39,45 ±1,98	(10)
24	-		23,88 2,06	(10)	-		-	

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

4.8.2.3 Einfluß auf das Feuchtgewicht von Leber und Niere

Wie Tabelle 8 und 9 zeigen, hatten die verabreichten Substanzen keinen nachhaltigen Einfluß auf das Feuchtgewicht der Leber und der Niere. Lediglich unter dem Einfluß von Thioharnstoff fällt auf, daß am 18. und am 22.Tag ein signifikant erniedrigtes Lebergewicht und am 22.Tag ein ebenfalls signifikant erniedrigtes Nierengewicht auftritt.

4.8.2.4 Einfluß auf den Proteingehalt der Leber und der Niere

Da von den eingesetzten Substanzen Einflüsse auf den Proteinstoffwechsel bekannt sind, interessierte in einem abschließenden Versuch, inwieweit sie Veränderungen im zellulären Proteingehalt bewirken. Zu diesem Zweck wurde das lösliche Protein in Leber und Niere bestimmt (Tabelle 10 und 11). Es ergaben sich dabei allerdings keine statistisch aussagekräftigen Unterschiede gegenüber den Kontrollen.

4.8.3 Einfluß auf das Pteridinmuster

4.8.3.1 Einfluß auf das Pteridinmuster in der Amnion- und in der Allantoisflüssigkeit

Die Behandlung der Embryonen mit den erwähnten Substanzen hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf den Pteridingehalt im Amnion (Tabelle 12 und 13).

Demgegenüber zeichneten sich unter dem Einfluß von Cycloheximid und Thioharnstoff deutliche Auswirkungen auf die Pteridinausscheidung in die Allantois (Tabellen 14 bis 17) ab. So verursachte die Gabe von Thioharnstoff eine Erniedrigung der Biopterinausscheidung, die im letzten Abschnitt des Untersuchungszeitraums besonders deutlich ausgeprägt war (Tabelle 15). Andererseits war die Wirkung von Cycloheximid auf den Biopterinspiegel im ersten Abschnitt des Untersuchungszeitraums besonders deutlich ausgefallen. So war nach Applikation von Cycloheximid am 10.Tag der

Inkubation bereits am 12. und 13. Bebrütungstag eine deutlich verringerte Pterinausscheidung und am 11., 12. und 13. Tag ein massiver Abfall der Biopterinausscheidung zu beobachten. Ohne wesentliche Effekte hingegen blieb die Behandlung mit L-Thyroxin.

4.8.3.2 Einfluß auf das Pteridinmuster in der Leber und in der Niere

Der im vorausgegangenen Abschnitt dargestellte Verlauf des Pteridinmusters in der Leber und in der Niere erfuhr unter dem Einfluß der verabreichten Substanzen (Tab. 18 - 20 bzw. 21 - 23) nur vereinzelt deutliche Veränderungen.

So war nach Gaben von Thioharnstoff die Biopterinkonzentration am 18. und am 22. Tag in der Leber deutlich erniedrigt. Ebenfalls niedriger war die Biopterin- und Pterinkonzentration in der Niere. Im Gegensatz dazu war die Isoxanthopterinkonzentration der Niere nach Applikation von Thioharnstoff deutlich erhöht.

Durch das Schilddrüsenhormon wurde lediglich am 15. Tag die Biopterin- und am 22. Tag die Pterinkonzentration verringert. Außerdem führte L-Thyroxin am 22. Tag zu einer erhöhten Isoxanthopterinkonzentration in der Leber.

Bei einer Behandlung mit Cycloheximid war eine erniedrigte Biopterinkonzentration in der Niere am 14. und 15. Tag, und eine erhöhte Isoxanthopterinkonzentration in der Leber insbesondere am 15. und am 22. Tag festzustellen.

Tab. 8 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Leberfeuchtgewicht

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Leberfeuchtgewicht in g							
10	31,3 ±3,1	(13)	-		-		-	
11	58,4 7,2	(12)	54,3 8,1	(9)	62,6 5,2	(9)	51,7 5,5	(11)
12	110,2 ±23,3	(14)	97,5 ±14,6	(11)	117,8 ±17,8	(10)	93,8 ±12,3	(12)
13	147,2 ±14,1	(10)	140,8 ±30,6	(10)	145,1 ±18,7	(10)	148,6 ±30,5	(10)
14	237,7 ±20,3	(12)	198,0 ±31,2	(11)	203,3 ±24,2	(9)	211,4 ±33,7	(10)
15	358,6 ±47,8	(10)	352,2 ±42,5	(10)	374,4 ±46,7	(8)	340,4 ±55,8	(9)
16	397,4 ±47,8	(10)	367,7 ±25,3	(10)	390,2 ±58,8	(9)	358,6 ±48,8	(10)
18	539,5 ±58,2	(10)	369,3 ^{xxx} ±55,9	(10)	499,8 ±43,3	(8)	528,4 ±42,1	(9)
22	830,5 ±82,4	(13)	460,1 ^{xxx} ±30,4	(12)	870,7 ±71,3	(8)	811,3 ±66,7	(10)
24	-		490,8 ±43,8	(10)	-		-	

x = $p \leq 0,05$

(n) = Anzahl der Proben

xx = $p \leq 0,01$

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 9 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Nierenfeuchtgewicht

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Nierenfeuchtgewicht in mg							
12	61,8 ±11,2	(12)	51,4 ±23,2	(10)	81,3 ^{xx} ±11,8	(10)	65,2 ±20,5	(11)
13	81,1 ±11,2	(11)	67,8 ±23,6	(10)	85,75 ±14,3	(10)	75,7 ±21,0	(10)
14	113,6 ±22,6	(12)	102,2 ±26,7	(11)	117,5 ±28,2	(9)	96,6 ±15,4	(10)
15	151,6 ±18,7	(11)	150,7 ±34,4	(11)	161,6 ±22,1	(8)	162,2 ±28,5	(9)
16	183,1 ±21,5	(10)	186,5 ±11,2	(10)	188,3 ±40,3	(9)	187,8 ±16,7	(10)
18	218,7 ±20,8	(10)	193,6 ±34,5	(10)	212,3 ±34,3	(10)	201,8 ±25,6	(9)
22	303,25 ±22,2	(13)	221,0 ^{xxx} ±34,1	(12)	339,6 ±60,7	(8)	278,9 ±38,9	(10)
24	-		263,3 ±33,2	(10)	-		-	

x = $p \leq 0,05$.

xx = $p \leq 0,01$

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit Kontrollen

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

Tab. 10: Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf den Proteingehalt der Leber

d	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
	Proteingehalt		(lösli. Protein)		in mg/100mg		Leberfeuchtgew.	
10	4,18	(s)	-		-		-	
11	4,36	(s)	4,51	(s)	4,23	(s)	4,25	(s)
12	4,49	(s)	5,21	(s)	4,69	(s)	4,39	(s)
13	4,72	(11)	4,91	(10)	4,61	(10)	4,55	(10)
	$\pm 0,38$		$\pm 0,63$		$\pm 0,87$		$\pm 0,80$	
14	4,98	(12)	5,32	(11)	4,92	(9)	4,76	(10)
	$\pm 0,81$		$\pm 0,37$		$\pm 1,43$		$\pm 0,93$	
15	5,13	(11)	5,27	(11)	6,18	(8)	6,36	(9)
	$\pm 1,18$		$\pm 0,74$		$\pm 0,68$		$\pm 0,88$	
16	5,48	(10)	5,27	(10)	6,18	(9)	6,36	(10)
	$\pm 0,87$		$\pm 0,53$		$\pm 0,82$		$\pm 0,38$	
18	5,39	(10)	5,81	(10)	6,23	(8)	5,93	(9)
	$\pm 1,47$		$\pm 1,05$		$\pm 1,31$		$\pm 1,07$	
22	5,87	(13)	5,91	(12)	5,76	(8)	5,86	(10)
	$\pm 0,46$		$\pm 0,92$		$\pm 0,97$		$\pm 0,99$	
24	-		6,33	(10)	-		-	
			$\pm 1,03$					

(s) = Sammelproben

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

Tab. 11 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf den Proteingehalt der Niere

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Proteingehalt (lösli. Protein) in mg/100mg Nierenfeuchtgew.							
12	1,78	(s)	1,56	(s)	1,42	(s)	1,35	(s)
13	1,81	(s)	1,87	(s)	1,61	(s)	1,59	(s)
14	2,17 ±0,51	(12)	2,45 ±0,27	(11)	2,33 ±0,18	(9)	1,92 ±0,32	(10)
15	2,84 ±0,82	(11)	2,29 ±0,72	(11)	2,77 ±0,28	(8)	2,40 ±0,18	(9)
16	3,59 ±0,58	(10)	3,89 ±0,43	(10)	3,01 ±0,37	(9)	3,32 ±0,96	(10)
18	4,18 ±1,09	(10)	4,32 ±0,61	(10)	4,14 ±0,82	(8)	4,71 ±0,98	(9)
22	4,79 ±0,44	(13)	5,02 ±1,03	(12)	4,56 ±1,13	(8)	4,44 ±0,79	(10)
24	-		4,74 ±0,41	(10)	-		-	

(s) = Sammelprobe

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

Tab. 12 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Biopterinmenge im Amnion

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Biopterinmenge in ng							
13	14,6	(11)	37,0	(9)	19,4	(8)	19,7	(9)
	±9,7		±27,5		±13,5		±5,7	
14	38,7	(11)	25,3	(11)	47,9	(9)	39,2	(10)
	±11,6		±8,6		±6,4		±18,1	
15	118,1	(11)	71,3	(11)	94,5	(8)	120,9	(9)
	±58,8		±31,5		±38,6		±24,8	
16	185,2	(10)	180,5	(10)	172,9	(9)	178,6	(9)
	±133,5		±56,3		±99,7		±79,8	

Tab. 13 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Isoxanthopterinmenge im Amnion

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Isoxanthopterinmenge in ng							
13	17,4	(11)	15,9	(9)	14,1	(8)	35,3	(9)
	±13,3		±23,7		±12,8		±41,6	
14	6,7	(11)	12,8	(11)	6,3	(9)	4,5	(10)
	±3,5		±8,8		±10,4		±3,2	
15	7,1	(11)	8,3	(11)	13,7	(8)	6,6	(9)
	±1,9		±3,8		±5,5		±3,2	
16	8,1	(10)	5,0	(10)	6,9	(9)	6,3	(9)
	±1,7		±1,8		±2,6		±2,3	

x = $p \leq 0,05$

(n) = Zahl der Proben

xx = $p \leq 0,01$

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 14 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Neopterinmenge in der Allantoisfl.

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Neopterinmenge in ng							
12	44,3 ±40,2	(12)	63,6 ±45,8	(10)	72,5 ±29,6	(10)	53,75 ±20,24	(11)
13	175,4 ±114,4	(11)	144,7 ±45,5	(10)	212,1 ±123,6	(10)	99,6 ±55,0	(10)
14	219,1 ±88,5	(12)	261,4 ±75,8	(11)	150,8 ±169,2	(9)	159,3 ±85,6	(10)
15	291,3 ±109,3	(11)	285,4 ±71,4	(11)	232,0 ±148,9	(8)	238,9 ±79,8	(9)
16	316,8 ±109,3	(10)	288,1 ±157,5	(10)	238,7 ±139,7	(9)	203,6 ±101,5	(10)

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

Tab. 15 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Biopterinmenge in der Allantoisfl.

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Biopterinmenge in ng							
10	291,9 ±62,0	(13)	-		-		-	
11	514,4 ±136,7	(12)	505,8 ±203,8	(12)	715,2 ±245,2	(10)	354,1 ^{xxx} ±112,5	(11)
12	998,6 ±345,2	(12)	933,3 ±456,2	(10)	1183,3 ±396,8	(10)	578,9 ^{xxx} ±132,8	(11)
13	1916,5 ±321,4	(11)	1320,6 ^{xxx} ±265,7	(10)	2045,0 ±620,5	(10)	1263,1 ^{xxx} ±274,3	(10)
14	3156,9 ±965,3	(12)	1804,2 ^{xxx} ±723,6	(11)	2734,7 ±725,8	(9)	2582,4 ±403,1	(10)
15	5701,1 ±1454,2	(11)	3268,4 ^{xxx} ±652,3	(11)	4747,3 ±997,6	(8)	5941,7 ±897,5	(9)
16	8848,5 ±2328,4	(10)	3886,2 ^{xxx} ±1551,7	(10)	5387,3 ^x ±1809,6	(9)	8465,7 ±3932,1	(10)

x = $p \leq 0,05$

(n) = Anzahl der Proben

xx = $p \leq 0,01$

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 16 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Pterinmenge in der Allantoisfl.

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Pterinmenge in ng							
12	129,9 ±89,9	(12)	149,5 ±117,1	(10)	116,8 ±97,4	(10)	44,4 ^x ±42,7	(11)
13	183,2 ±118,7	(11)	193,2 ±197,5	(10)	194,6 ±89,9	(10)	64,2 ^{xx} ±68,3	(10)
14	312,6 ± 37,4	(12)	401,9 ±351,8	(11)	263,8 ±56,59	(9)	94,9 ³ ±81,5	(10)
15	1210,6 ±1018,7	(11)	461,9 ^x ±117,6	(11)	809,5 ±468,2	(8)	694,9 ±392,1	(9)
16	1111,7 ±740,2	(10)	508,3 ±302,1	(10)	1169,4 ±601,7	(9)	1492,5 ±398,4	(10)

x = $p \leq 0,05$

(n) = Anzahl der Proben

xx = $p \leq 0,01$

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 17 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Isoxanthopterinmenge in der Allantoisflüssigkeit

	Kontrolle	Thioharnstoff	L-Thyroxin	Cycloheximid		
d	Isoxanthopterinmenge in ng					
10	926,5 ±261,8	(43)	-	-		
11	2216,3 ±581,3	(12)	1963,8 ±812,6	(12) 2850,1 ±551,9	(10) 1673,7 ^x ±349,8	(11)
12	3587,9 ±973,6	(12)	2589,4 ±572,7	(10) 3361,2 ±1195,8	(10) 2557,6 ±647,7	(11)
13	4548,3 ±2089,2	(11)	2800,1 ±1264,7	(10) 3077,5 ±813,2	(10) 3242,6 ±1304,7	(10)
14	3087,4 ±1025,6	(12)	1944,6 ±807,1	(11) 2536,9 ±1795,0	(9) 2377,8 ±1932,2	(10)
15	2827,2 ±1536,2	(11)	2456,8 ±1447,4	(11) 2683,9 ±1844,7	(8) 2199,4 ±1739,7	(9)
16	2966,3 ±1332,2	(10)	992,3 ^{xxx} ±255,6	(10) 1446,4 ^x ±860,1	(9) 2253,8 ±1348,9	(10)

x = $p \leq 0,05$

xx = $p \leq 0,01$

xxx = $p \leq 0,001$

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 18 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Biopterinkonzentration in der Leber

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Biopterinkonzentration in ng/100mg Leberfeuchtgewicht							
10	20,7	(s)	-		-		-	
11	26,4	(s)	28,1	(s)	28,7	(s)	31,8	(s)
12	29,1	(s)	31,9	(s)	29,8	(s)	27,2	(s)
13	26,8 ±8,5	(11)	27,9 ±5,7	(10)	23,0 ±8,9	(10)	24,8 ±6,2	(10)
14	28,7 ±7,7	(12)	33,8 ±7,3	(11)	23,7 ±6,4	(9)	26,6 ±3,7	(10)
15	28,3 ±10,1	(10)	29,6 ±10,3	(10)	32,9 ±7,7	(8)	32,6 ±8,4	(9)
16	32,9 ±5,3	(10)	34,5 ±4,9	(10)	37,5 ±8,1	(9)	40,7 ±10,8	(10)
18	59,6 ±9,6	(10)	38,7 ^{xxx} ±5,3	(10)	51,0 ±17,4	(8)	45,2 ^x ±7,8	(9)
22	74,6 ±14,0	(13)	48,8 ^{xxx} ±5,4	(qw)	65,0 ±9,3	(8)	73,3 ±7,6	(10)
24	-		64,4 ±18,5	(10)	-		-	

x = $p \leq 0,05$

xx = $p \leq 0,01$

xxx = $p \leq 0,001$

(s) = Sammelprobe

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 19 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Pterinkonzentration in der Leber

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Pterin in ng/100mg Leberfeuchtgewicht							
10	11,96	(s)	-		-		-	
11	10,42	(s)	12,36	(s)	11,31	(s)	9,18	(s)
12	12,48	(s)	15,74	(s)	13,43	(s)	17,61	(s)
13	11,81 ±5,51	(10)	17,83 ±9,36	(10)	17,31 ±9,42	(10)	14,47 ±4,15	(10)
14	13,46 ±5,42	(12)	18,76 ±6,26	(11)	20,31 ±6,63	(9)	18,28 ±9,16	(10)
15	20,26 ±7,43	(10)	21,78 ±5,34	(10)	16,87 ±8,91	(8)	18,27 ±4,18	(9)
16	32,57 ±15,32	(10)	27,71 ±13,83	(10)	37,12 ±16,57	(9)	44,16 ±26,24	(10)
18	50,21 ±22,82	(10)	37,11 ±16,95	(10)	36,48 ±16,34	(8)	44,67 ±19,52	(9)
22	56,38 ±18,43	(13)	43,77 ±28,16	(12)	34,31 ±19,25	(8)	52,69 ±25,17	(10)
24	-		46,54 ±12,13	(10)	-		-	

(s) = Sammelprobe

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

Tab. 20 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Isoxanthopterinkonzentration in der Leber

d	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
	Isoxanthopterin in ng/100mg Leberfeuchtgewicht							
10	0,66	(s)	-		-		-	
11	0,63	(s)	0,77	(s)	0,83	(s)	0,73	(s)
12	0,81	(s)	0,89	(s)	0,79	(s)	0,68	(s)
13	1,01 ±0,23	(10)	0,91 ±0,43	(10)	1,14 ±0,71	(10)	0,81 ±0,44	(10)
14	0,84 ±0,18	(12)	0,99 ±0,35	(11)	0,87 ±0,28	(9)	1,16 ±0,74	(11)
15	0,83 ±0,42	(10)	1,21 ±0,37	(10)	1,41 ±0,71	(8)	1,59 ^{xx} ±0,48	(9)
16	1,27 ±0,22	(10)	1,66 ±0,41	(10)	1,32 ±0,35	(9)	1,39 ±0,32	(10)
18	1,12 0,31	(10)	1,26 0,89	(10)	1,78 0,87	(8)	1,47 0,62	(9)
22	0,66 ±0,29	(13)	0,99 ±0,32	(12)	0,95 ±0,74	(8)	2,11 ^{xx} ±1,43	(10)
24	-		0,85 ±0,35	(10)	-		-	

(s) = Sammelproben

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

xx = $p \leq 0,01$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 21 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Biopterinkonzentration in der Niere

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Biopterinkonzentration in ng/100mg Nierenfeuchtgewicht							
12	3,26	(s)	2,53	(s)	1,85	(s)	1,74	(s)
13	3,52	(s)	3,01	(s)	3,11	(s)	3,02	(s)
14	8,98 ±0,46	(12)	6,57 ^{xxx} ±0,54	(11)	8,92 ±2,80	(9)	6,17 ^{xxx} ±0,46	(9)
15	17,72 ±3,73	(10)	13,85 ±4,51	(10)	12,17 ^{xx} ±3,86	(8)	8,12 ^{xxx} ±3,28	(9)
16	28,04 ±8,04	(10)	18,57 ±8,89	(10)	27,44 ±5,29	(9)	26,81 ±4,56	(10)
18	29,43 ±9,37	(10)	23,47 ±5,42	(10)	37,07 ±12,31	(8)	32,61 ±6,83	(9)
22	36,22 ±8,26	(13)	24,57 ^x ±7,63	(12)	34,40 ±4,54	(8)	32,31 ±8,53	(10)
24	-		44,51 ±21,93	(10)	-		-	

x = $p \leq 0,05$

xx = $p \leq 0,01$

xxx = $p \leq 0,001$

(s) = Sammelproben

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 22 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Pterinkonzentration in der Niere

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Pterin in ng/100mg Nierenfeuchtgewicht							
14	5,04 ±1,99	(12)	5,06 ±1,67	(11)	-		2,83 ^x ±1,45	(9)
15	5,31 ±2,23	(10)	5,76 ±1,81	(10)	4,67 ±1,27	(8)	4,23 ±1,65	(9)
16	5,73 ±1,33	(10)	6,65 ±2,78	(10)	5,46 ±2,31	(9)	5,83 ±1,18	(10)
18	9,66 ±3,86	(10)	7,43 ±4,88	(10)	6,83 ±2,47	(8)	7,95 ±1,67	(9)
22	17,83 ±4,47	(13)	11,52 ^{xxx} ±1,84	(12)	9,21 ^{xxx} ±3,33	(8)	17,97 ±9,62	(10)
24	-		13,58 6,32	(10)	-		-	

x = $p \leq 0,05$

(n) = Anzahl der Proben

xx = $p \leq 0,01$

d = Bebrütungstag

xxx = $p \leq 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Tab. 23 : Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf die Isoxanthopterinkonzentration der Niere

	Kontrolle		Thioharnstoff		L-Thyroxin		Cycloheximid	
d	Isoxanthopterin in ng/100mg Nierenfeuchtgewicht							
12	1,42	(s)	1,83	(s)	1,43	(s)	1,02	(s)
13	1,85	(s)	1,77	(s)	1,58	(s)	1,44	(s)
14	2,32	(12)	2,03	(11)	2,93	(9)	1,47	(10)
	±0,58		±0,84		±0,81		±0,27	
15	4,18	(11)	2,47	(11)	4,72	(8)	6,88	(9)
	±2,12		±2,47		±1,81		±3,14	
16	7,44	(10)	5,32	(10)	7,65	(9)	10,02 ^x	(10)
	2,32		1,18		2,39		2,12	
18	5,23	(10)	6,39	(10)	6,72	(8)	6,11	(9)
	±2,18		±2,99		±5,97		±5,47	
22	2,45	(13)	10,94 ^{xxx}	(12)	5,69	(8)	3,88	(10)
	±1,13		±6,26		±4,88		±1,02	
24	-		5,51	(10)	-		-	
			±2,43					

x = $p \leq 0,05$

xx = $p \leq 0,01$

xxx = $p \leq 0,001$

(n) = Anzahl der Proben

d = Bebrütungstag

(s) = Sammelproben

verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

Diskussion

Über das Vorkommen von unkonjugierten Pteridinen im Hühnerei liegen bisher keine Informationen vor.

Die Bestimmungen im unbebrüteten Ei ergaben, daß im Eiklar Pteridine in Konzentrationen über 0,5ng/ml nicht nachweisbar waren. Offensichtlich werden diese Pteridine vom Muttertier in den Eidotter abgegeben.

Während der Bebrütung blieb es im Dotter jedoch nicht bei dieser relativ niedrigen Konzentration. Ab dem 5. Tag trat eine deutliche Steigerung der Biopterin- und der Pterinmenge auf. Zu diesem Zeitpunkt war auch erstmals Isoxanthopterin nachweisbar.

In der subembryonalen Flüssigkeit, die ab dem 2. Bebrütungstag gebildet wird und bis zum 15. Tag bereits wieder verschwunden ist (NEW, 1956; ROMANOFF, 1967), kam es vom 5. bis zum 10. Tag zu einem massiven Anstieg der Pteridinwerte, wobei die Konzentrationen die des Eidotters deutlich übertreffen. Es ist anzunehmen, daß die Pteridinmetaboliten im Dottersack synthetisiert werden. Die im Dotter vorkommenden Purine und Nukleoside (ROMANOFF, 1967) sind als mögliche Ausgangsstoffe hierfür anzusehen.

Das Vorkommen von Isoxanthopterin im Dotter und in der subembryonalen Flüssigkeit überrascht insofern nicht, als Pterin, das Substrat der Xanthindehydrogenase (XDH), und XDH im Dottersack vorkommen (MORGAN, 1930).

Welche Funktion den Pteridinen im Dotter und in der subembryonalen Flüssigkeit zukommt, ist nicht bekannt. Man kann aber davon ausgehen, daß zumindest die Pteridine der sub-

embryonalen Flüssigkeit dem Embryo sehr früh zugeführt werden, da die subembryonale Flüssigkeit die primäre Ernährung des Vogels darstellt. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß im Augenpigment, das beim Vogel bereits sehr frühzeitig ausgebildet wird, Pteridine vorkommen (ZIEGLER, 1960; RAO und COTLIER, 1985). Außerdem sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß gewisse Pteridine das Wachstum beeinflussen können, wie in Abschnitt 2.1.5 ausgeführt wurde. Auch bei der Entwicklung des Gehirns spielen Pteridine eine Rolle. So ist Tetrahydrobiopterin als Coenzym bei der Synthese von Neurotransmittern wie Dopamin und Serotonin von Bedeutung. Möglicherweise müssen diese Organe mit exogenen Pteridinen, welche im Dottersack gebildet werden, versorgt werden.

Wie in der Amnionflüssigkeit des Menschen (NIEDERWIESER et al., 1985; DHONDT et al., 1985; SAWADA et al., 1985; BICHLER et al., 1983) wurden auch in der Amnionflüssigkeit des Hühnerembryos Pteridine gefunden. Im Gegensatz zum Pteridmuster des Menschen, bei dem Neopterin den größten Anteil darstellt, kommt beim Vogel kein Neopterin vor. Im Amnion des Hühnerembryos ist vorrangig Biopterin anzutreffen. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, daß das Amnion des Vogels sich in Entwicklung und Funktion von dem des Menschen stark unterscheidet. Beim Vogel gibt es während des größten Teils der Embryonalphase eine gut ausgebildete Allantois, die als Ausscheidungsreservoir dient. Demgegenüber degeneriert der extraembryonale Anteil der Allantois beim Menschen bereits während des 2. Schwangerschaftsmonats (MOORE, 1985). Ihre Funktion wird nachfolgend vom Amnion übernommen. Beim Menschen ist das Amnion das eigentliche Sammelbecken für Ausscheidungen des Embryos. Es ist demnach nicht verwunderlich, wenn sich die Pteridinzusammensetzung und die Pteridinkonzentration im Amnion des Menschen von der des Vogels unterscheiden. Auffallend ist, daß die

Pteridine erst ab dem 13. Tag in der Amnionflüssigkeit nachzuweisen waren. Da zu diesem Zeitpunkt eine Verbindung zwischen Eiklar und Amnion einerseits und zwischen Eiklar und Dottersack andererseits entsteht (SAITO et al. 1965), ist nicht auszuschließen, daß Pteridine über diese Verbindung vom Dottersack in das Amnion gelangen.

In der Allantoisflüssigkeit wurden Neopterin, Biopterin, Pterin und Isoxanthopterin identifiziert. Generell nahm die ausgeschiedene Pteridinmenge mit fortschreitender Inkubationsdauer deutlich zu. Nur der Isoxanthopteringehalt hatte bereits am 13. Tag sein Maximum erreicht und fiel dann wieder ab. Es ist kein Vorgang bekannt, der den Verlauf der Isoxanthopterinausscheidung in der 2. Hälfte der Embryonalentwicklung erklärt. Es könnte aber sein, daß Isoxanthopterin zum entsprechenden Lumazin abgebaut wird.

Im Vergleich zu Dotter, Amnionflüssigkeit, Subembryonalflüssigkeit und Leber war der Isoxanthopteringehalt in der Allantoisflüssigkeit relativ hoch. Die Ursache hierfür dürfte in der hohen XDH-Aktivität der Niere begründet sein (CHAUBE, 1962). Dieses Enzym katalysiert, wie bereits erwähnt, die Bildung von Isoxanthopterin aus Pterin. Mengemäßig den größten Anstieg der zuvor genannten Pteridine findet man beim Biopterin. Die Ausscheidungsrate war auch bezogen auf den Creatiningehalt relativ hoch.

Bei Neopterin und Pterin, die beide erst ab dem 12. Tag regelmäßig in nachweisbaren Mengen vorkommen, war der Anstieg deutlich schwächer ausgeprägt als bei Biopterin. Im Vergleich zu den Verhältnissen in Dotter, subembryonaler Flüssigkeit und Leber war das Biopterin/Pterin-Verhältnis in der Allantoisflüssigkeit relativ niedrig. Wie bereits angedeutet, entspricht die Allantoisflüssigkeit des

Vogels hinsichtlich der Ausscheidung der Amnionflüssigkeit des menschlichen Fetus. Einem Verhältnis von 5:1 im Amnion des Menschen in der 28. Schwangerschaftswoche (DHONDT et al., 1986) steht ein Verhältnis von 1:10 in der Allantoisflüssigkeit am 14. Bebrütungstag gegenüber. DUCH et al. (1984) fanden bei Untersuchungen an verschiedenen Säugern und am Menschen, daß Neopterin nur beim Menschen und beim Affen in den Körperflüssigkeiten vorkommen. KOKOLIS et al. (1985) fanden zwar Neopterin im Serum von Säugern, jedoch in sehr niedrigen Konzentrationen.

In der Leber wurden Biopterin und Pterin ab dem 10. Tag der Inkubation in Konzentrationen über 1ng/100mg gefunden. Isoxanthopterin kommt vom 10. Tag bis zum Schlupf nur in geringer Konzentration vor. Das dürfte ursächlich im Zusammenhang mit der niedrigen Xanthindehydrogenase-Aktivität in diesem Organ während der Embryonalphase stehen (CHAUBE, 1962). Auffallend ist, daß in der Leber ab dem 14. Tag das Biopterin/Pterin-Verhältnis deutlich abnimmt. Da in Dotter und Leber ein ähnliches Biopterin/Pterin-Verhältnis auftrat, ist anzunehmen, daß diese Parallelität auf die Aufnahme von Pteridinen aus dem Dotter zurückzuführen ist.

In der Niere kamen zwar grundsätzlich die selben Pteridine vor, im Gegensatz zur Leber ist aber in der Niere die Isoxanthopterinkonzentration deutlich höher. Hier kommt möglicherweise die Tatsache zum Ausdruck, daß die Xanthindehydrogenase in der Niere während der pränatalen Entwicklungsphase eine höhere Aktivität als in der Leber aufweist (CHAUBE, 1962). Bedenkt man, daß sowohl in der Niere als auch in der Allantoisflüssigkeit eine relativ hohe Isoxanthopterinkonzentration auftrat, so liegt die Vermutung nahe, daß die Niere für die Bildung und Ausscheidung von Isoxanthopterin eine wichtige Rolle spielt.

Ein weiterer Unterschied zwischen Leber und Niere war dadurch gegeben, daß Biopterin in der Niere bis zum 16. Tag deutlich in seiner Konzentration anstieg, in der Leber der Konzentrationsanstieg jedoch erst zwischen dem 16. und dem 18. Tag deutlich war. Während auch Pterin in der Leber ab dem 14. Tag in seiner Konzentration stark anstieg, nahm die Pterinkonzentration in der Niere nur sehr wenig zu. Demnach scheint Pterin, welches, wie FUKUSHIMA und SHIOTA (1974) zeigten, im Gegensatz zu Biopterin auch aus Folsäure gebildet wird, in der Leber eine wichtigere Rolle zu spielen als in der Niere.

Wirkung von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid

Thioharnstoff führte bei keiner der getesteten Dosierungen während des regulären Entwicklungszeitraums zu einem vermehrten Absterben von Embryonen im Ei, wie aus Abschnitt 4.8.1 zu ersehen ist. Die Embryonen überlebten je nach Dosis bis zum 28. Tag und in Einzelfällen auch noch länger. Die entwicklungsverzögernde Wirkung entspricht den Ergebnissen von ROMANOFF und LAUFFER (1956) und GROSSOWICZ (1946). Allerdings konnte im Gegensatz zu den Untersuchungen dieser Autoren in der vorliegenden Arbeit nach dem 23. Tag kein Schlupf mehr beobachtet werden.

Die Applikation von L-Thyroxin hat in der verwendeten Dosis keinen Einfluß auf den Schlupfzeitpunkt. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden von FREEMANN (1964), BALABAN und HILL (1971), OPPENHEIM (1973) und WITTMANN et al. (1984), die nach Applikation von L-Thyroxin um den 17. Tag einen vorzeitigen Schlupf auslösten, entspricht aber den Resultaten von BAST (1967). Offensichtlich wirkt sich L-Thyroxin, am 10. Tag appliziert, noch nicht nachhaltig auf die embryonale Entwicklung aus. Daß für eine entwicklungshemmende Wirkung die eingesetzte Dosis zu gering war, scheint nicht sehr wahrscheinlich, da eine Erhöhung der L-Thyroxindosis zum Absterben der

Embryonen führte. GROSSOWICZ (1946) hatte beim Einsatz von L-Thyroxin zur Aufhebung der Thioharnstoffwirkung ebenfalls festgestellt, daß bei Applikation vor dem 14. Tag L-Thyroxin in niedriger Dosierung gar nicht und in hoher Dosierung stark toxisch wirkt.

Cycloheximid führte bereits in Mengen ab 5,2 pmol pro Ei zu deutlichen Verlusten. Bei einer niedrigeren Dosierung entspricht die Schlupfrate nahezu der der Kontrollen. Ein Einfluß auf das Schlupfgeschehen konnte unter diesen Bedingungen nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fand PRUY (1982) nach Applikation von Cycloheximid am 17. Tag eine deutliche Schlupfverzögerung.

Insgesamt ergaben diese Versuche, daß der Embryo am 10. Entwicklungstag gegenüber toxischen Substanzen besonders empfindlich ist, was ROMANOFF und LAUFFER (1956) auch schon bei Thioharnstoff feststellten.

Die Behandlung mit den erwähnten Substanzen wirkte sich kaum auf die allgemeinen Parameter aus. So veränderten sich Amnion- und Allantoisvolumen sowie der Proteingehalt der Leber und der Niere unter dem Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid nicht wesentlich, nur beim Embryofeuchtgewicht, beim Ei/Embryogewichtsverhältnis sowie beim Leber- und Nierenfeuchtgewicht waren deutliche Auswirkungen zu beobachten.

Besonders auffallend waren die Effekte beim Thioharnstoff. Er verursachte eine Erniedrigung des Embryofeuchtgewichtes, eine Erhöhung des Ei/Embryogewichtsverhältnisses und ein verringertes Wachstum der Leber und zum Teil auch der Niere. Aus diesen Parametern ist ein deutlicher Hinweis auf die entwicklungsverzögernde Wirkung des Thioharnstoffs ersichtlich, der mit der Beobachtung, daß der Schlupf erst am 27. Tag eingeleitet wurde, übereinstimmt. Bemerkenswert ist, daß diese Befunde erst gegen Ende der

regulären Inkubationszeit (18. bis 22. Tag) an Deutlichkeit zunahmen.

Demgegenüber verursachte L-Thyroxin nur vereinzelt Veränderungen der eben genannten Parameter. Insgesamt wurden jedoch bei L-Thyroxin keine nachhaltigen Auswirkungen festgestellt. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß L-Thyroxin keinen Einfluß auf den Schlupfzeitpunkt zur Folge hatte.

Auch bei Cycloheximid konnten keine massiven Auswirkungen auf die vorher genannten Parameter festgestellt werden. Lediglich das Ei/Embryogewichtsverhältnis (Tab. 6) lag im Vergleich zu den Kontrollen am 12. und am 13. Tag signifikant niedriger. Offensichtlich hatten sich diese Veränderungen im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder ausgeglichen.

Nachdem sich nun gezeigt hatte, daß die eingesetzten Substanzen sich sehr unterschiedlich auf die Entwicklung auswirkten, wurde untersucht, ob sich diese Auswirkungen im Pteridinstoffwechsel widerspiegeln.

Betrachtet man das Pteridinmuster im Amnion unter diesem Aspekt, so löste keine der eingesetzten Substanzen eine deutliche Veränderung des Pteridinmusters aus. Allem Anschein nach haben Entwicklungsstörungen, wie sie durch Thioharnstoff ausgelöst wurden, keine deutliche Auswirkung auf die Pteridinzusammensetzung im Amnion.

Demgegenüber hatte Thioharnstoff eine deutliche Verringerung der Biopterinausscheidung in die Allantoisflüssigkeit zur Folge, wobei sich auch hier der Effekt mit fortschreitender Entwicklung verdeutlichte. Vereinzelt sind

auch bei den übrigen Pteridinen Unterschiede angedeutet, denen aber keine große Bedeutung beizumessen ist. Demnach spiegelt sich die Wirkung von Thioharnstoff in erster Linie in der Biopterinausscheidung wider.

Demgegenüber bewirkte L-Thyroxin keine Veränderung der Biopterinausscheidung in die Allantois. Dies ist auch nicht Überraschend, da L-Thyroxin ja auch keine deutlichen Auswirkungen auf die Entwicklung hatte.

Cycloheximid schließlich verursachte einen deutlichen Abfall der Biopterin- und Pterinausscheidung in die Allantois. Zu bemerken ist, daß dieser Effekt sich in den ersten Tagen nach der Behandlung einstellte. Offensichtlich wird die Noxe durch Cycloheximid in den ersten Tagen der Applikation gesetzt. Dies war auch schon beim Ei/Embryoverhältnis aufgefallen. Da im weiteren Verlauf der Entwicklung keine Veränderungen mehr auftraten und Cycloheximid auch keinen Einfluß auf den Schlupfzeitpunkt zur Folge hatte, muß angenommen werden, daß es dem Embryo gelingt, die durch Cycloheximid verursachte Schädigung wieder auszugleichen.

Betrachtet man das Pteridinmuster der Leber und der Niere unter diesem Aspekt der Toxizität, so fällt auf, daß Thioharnstoff vor allem in der Leber eine Depression der Biopterinkonzentration verursachte. Auch dieser Effekt trat gegen Ende der Entwicklung auf. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als Thioharnstoff zu diesem Zeitpunkt auch eine deutliche Wachstumsdepression der Leber bewirkt. Er deutet auf eine gestörte Biopterinsynthese bei einer beeinträchtigten Leberentwicklung hin. In dieses Konzept fügt sich auch der Befund von ABOU-DONIA et al. (1985), wonach es bei Thyroidektomie in der Leber von Ratten zu einem Abfall des H_4 -Biopterinspiegels und der GTP-CH-Aktivität kommt.

Cycloheximid löste hingegen einen Effekt auf die Isoxanthopterinkonzentration in der Leber aus. Im Gegensatz zu den vorher angeführten Wirkungen des Cycloheximids war hier der Effekt im Endabschnitt der Entwicklung deutlich ausgeprägt. Es kam dabei zu einer Erhöhung der Isoxanthopterinkonzentration. Eine Erklärung hierfür bietet sich aus den Versuchen von PRUY (1982) an, der zeigen konnte, daß dieses Antibiotikum beim Hühnerembryo in der Endphase der Embryonalentwicklung eine Stimulation der Xanthindehydrogenase-Aktivität verursacht. Die erhöhte Aktivität dieses Enzyms, welches, wie bereits erwähnt, die Bildung von Isoxanthopterin aus Pterin katalysiert, könnte die Ursache für die erhöhte Isoxanthopterinkonzentration sein. Dies steht auch im Einklang mit dem Befund, daß Cycloheximid in der Niere keine deutlichen Auswirkungen auf die Isoxanthopterinkonzentration hatte. Bei den Untersuchungen von PRUY (1982) war die renale Xanthindehydrogenase-Aktivität durch Cycloheximid ebenfalls nicht verändert.

In der Niere verursachte Thioharnstoff eine Erhöhung der Isoxanthopterinkonzentration und eine erniedrigte Pterinkonzentration, was gleichfalls für eine vermehrte Bildung von Isoxanthopterin aus Pterin spricht. Da diese Effekte jedoch nur am 22. Tag erkennbar waren, stellt sich die Frage, ob sie eine massive Einwirkung widerspiegeln. Da zudem Thioharnstoff die renale Xanthindehydrogenase-Aktivität nicht steigert, wie oben erwähnt, ihre Aktivität aber offensichtlich für die Ausbildung von Isoxanthopterin von Bedeutung ist, ist die erhöhte Isoxanthopterinkonzentration in der Niere zu diesem Zeitpunkt nicht verständlich. Schließlich verursachte auch L-Thyroxin am 22. Tag einen Abfall in der Pterinkonzentration, die zwar von einem Anstieg der Isoxanthopterinkonzentration begleitet wurde, welcher aber auf Grund der großen Streuung der Werte nicht signifikant war. Da auch hier der Effekt auf einen Tag begrenzt ist, kommt ihm vermutlich keine große Bedeutung zu.

Die Biopterinkonzentration der Niere wurde dagegen durch Cycloheximid bis zum 15. Tag deutlich verringert. Dies stimmt mit den Verhältnissen in der Allantoisflüssigkeit überein und bestätigt die Bedeutung der Niere für den Pteridinstoffwechsel.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, daß bei einem Eingriff in die Entwicklung, wie er von Thioharnstoff ausgelöst wird, mit einer Verminderung der Biopterinausscheidung in die Allantois und der Biopterinsynthese in Leber und Niere zu rechnen ist.

Auch der Eingriff mit Cycloheximid äußert sich in erster Linie in einer Abnahme der Biopterinausscheidung in die Allantois, wobei hier noch eine Verringerung der Pterinausscheidung hinzukommt.

Ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Wirkung von Thioharnstoff und Cycloheximid besteht darin, daß im Falle eines Eingriffs mit Thioharnstoff in die Entwicklung der Effekt eher gegen Ende der Entwicklung auftritt, während Cycloheximid seine Wirkung kurz nach der Applikation entfaltet. Allem Anschein nach erholt sich der Embryo von den durch Cycloheximid gesetzten Noxen im Verlauf der Embryogenese wieder.

Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Vorkommen von Pteridinen in verschiedenen Kompartimenten des Hühnereis bzw. des Embryos untersucht.

Die Untersuchungen ergaben, daß im Dotter bereits vor der Bebrütung Biopterin und Pterin vorkommen. Die zunehmenden Konzentrationen im Eidotter und in der subembryonalen Flüssigkeit weisen auf eine Neusynthese von Biopterin, Pterin und Isoxanthopterin im Dottersack hin. Im Eiklar wurden keine Pteridine nachgewiesen.

Biopterin und Isoxanthopterin konnten in der Allantoisflüssigkeit bereits vom 10. Tag an und in der Amnionflüssigkeit erst ab dem 13. Tag festgestellt werden. Ab dem 12. Tag traten in der Allantoisflüssigkeit auch Neopterin und Pterin auf. Mit zunehmender Entwicklungsdauer stieg die Gesamtmenge der untersuchten Pteridine, mit Ausnahme von Isoxanthopterin, deutlich an. Am stärksten war der Anstieg bei Biopterin.

Die Untersuchungen in der Leber und in der Niere ab dem 10. bzw. dem 12. Tag der Inkubation zeigten, daß hier ebenfalls Biopterin, Pterin und Isoxanthopterin vorkommen. Mit fortschreitender Entwicklungsdauer nahm die Konzentration der einzelnen Pteridine in den Organen zu. Die Isoxanthopterinkonzentration fiel jedoch bereits vor Ende der Inkubation wieder ab.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid auf das Pteridinmuster in Amnion und Allantois sowie Leber und Niere untersucht. Als Applikationszeitpunkt wurde der 10. Tag gewählt. Von den verabreichten Substanzen zeigte Thioharnstoff den deutlichsten Einfluß auf die Entwicklung. Er verhinderte sogar den Schlupf.

Auch im Hinblick auf die Pteridine lösten lediglich Thioharnstoff und Cycloheximid nachhaltige Veränderungen im Pteridinmuster aus. Der Effekt von Thioharnstoff trat

verstärkt gegen Ende der Inkubation auf, während sich Cycloheximid kurz nach der Applikation am deutlichsten auswirkte. Diese Substanzen verursachten auch die deutlichsten Veränderungen in Organ- und Embryofeuchtgewicht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß ein Eingriff in die Entwicklung sich insbesondere auf die Biopterinsynthese und die Biopterinausscheidung auswirkt.

Summary

Pteridine pattern of the developing chick embryo and its change as caused by thiourea, L-thyroxine and cycloheximide.

In the first part of the thesis the occurrence of pteridines in various compartments of the chick embryo and the egg was determined. The data showed, that even before incubation biopterin and pterin were found in the yolk. The increase in pteridine concentrations in yolk and subembryonic fluid indicates an additional synthesis of biopterin, pterin and isoxanthopterin. No pteridines were detected in egg albumen.

In contrary to allantois, biopterin and isoxanthopterin were detected for the first time on day 13 of incubation. On the 12th day also neopterin and pterin could be measured in the allantoic fluid. The total amount of the examined pteridines, except isoxanthopterin, increased significantly during the period of development.

The experiments in liver and kidney from the 10th day on showed the existence of biopterin, pterin and isoxanthopterin in these organs. During development the concentrations of the various pteridines increased in the organs. Toward the end of incubation, however, the concentration of isoxanthopterin dropped again.

In the second part of the thesis the influence of thiourea, L-thyroxine and cycloheximide on pteridine patterns in allantoic and amniotic fluids, liver and kidney were investigated. The application was performed on day 10. Compared with L-thyroxine and cycloheximide thiourea exerted a significant influence on development and prevented also the hatching process.

As to pteridines, only thiourea and cycloheximide caused significant alterations in the pteridine pattern. The effect of thiourea was mainly detected at the end of incubation, while cycloheximide showed shortly after incubation an influence on the pteridine pattern.

7 Literaturverzeichnis

- ABOU DONIA, M. M., A. J. DANIELS, E. DILIBERTO JR., C. A. NICHOL and G. H. VIVEROS (1985)
Endocrine and metabolic regulation of GTP-cyclohydrolase activity and tetrahydrobiopterin levels in rat liver
IN: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines Vol. 4
PFLEIDERER, W., H. WACHTER AND H. CH. CURTIUS (eds.)
Walter de Gruyter, Berlin/New York, 209 - 220
- ALBERT, A., D. J. BROWN and H. C. S. WOOD (1954)
Pteridine studies Part V: The monosubstituted pteridines
J. chem. Soc. (1954), 3832 - 3839
- ANDONONSKAJA-RENN, B. and H.-J. ZEITLER (1983)
Separation of pteridines from blood cells and plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography
Analytical Biochem. 133, 68 - 78
- AULITZKY, W., J. FRICK, D. FUCHS, A. HAUSEN, G. KUNIT, G. REIBNEGGER and H. WACHTER (1984)
Neopterin, ein neuer immunologischer Parameter für maligne Tumoren des Urogenitaltraktes
Österr. Gesellschaft f. Biochem. u. klin. Chem. 365, 902
- BALABAN, M. and J. HILL (1971)
Effects of thyroxine level and temperature manipulations upon the hatching of the chick embryos (Gallus domesticus)
Developm. Psychobiol. 4, 17 - 35
- BAST, J. P. (1987)
Der Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf die DNA-Synthese beim Hühnerembryo
Inauguraldissertation, Tiermed. Fakultät München
- BENETT, JR., L. L., V. L. WARD and R. W. BROCKMAN (1964)
Inhibition of DNA-synthesis in mammalian cells by actidione
Biochim. Biophys. Acta, 87, 60 - 69
- BEYER, R. E. (1952)
The effect of thyroxin upon the general metabolism of the intact chick embryo
Endocr. 50, 497 - 502
- BICHLER, A., H. HETZEL, L. MARTH, D. FUCHS, A. HAUSEN. G. REIBNEGGER and H. WACHTER (1982)
Significance of urinary neopterin in gynecology and obstetrics: oncology, pregnancy, amniotic fluid
IN: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridins Vol. 1
H. WACHTER, H. CH. CURTIUS and W. PFLEIDERER (eds.)
Walter de Gruyter, Berlin/New York 141 - 156

- BLAIR, J. A. and J. GRAHAM (1960)
Identity of pteridines present in snake skins
Chem. & Ind. 5, 1158 - 1159
- BORGES, M., J. LABOURNE and S. H. INGBAR (1980)
Changes in hepatic iodothyronine metabolism during ontogeny
of the chick embryo
Endocr. 107, 1751 - 1761
- BRADFORD, M. M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
binding
Analyt. biochem., 72, 248 - 254
- BRADWAY, W. (1929)
Morphogenesis of the thyroid follicles of the chick
Anat. Rec. 42, 157 - 167
- BRANDSTETTER, W. A., R. L. WATTERSON and P. VENEZIANO (1962)
Modified growth pattern of the musculus complexus (hatching
muscle) of chick embryos following thiourea treatment or
hypophysectomy by partial decapitation
Anat. Rec. 142, 299 - 307
- BROWN, G. M. (1971)
The biosynthesis of pteridines
Adv. Enzymol. 35, 35 - 77
- BRUNNER, R. and G. MACHEK (1965)
Die Antibiotika, Band II: Die mittleren Antibiotika
HANS KARL (ed.) Nürnberg 626 - 644
- CHAUBE, S. (1962)
Hypoxanthine dehydrogenase in the developing chick
embryonic kidney
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 340 - 342
- COLOMBO, B., L. FELICETTI and C. BAGLIONI (1965)
Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in
rabbit reticulocytes
Biochem. Biophys. Research Commun. 18, 389 - 395
- COONEY, W. J. and S. G. BRADLEY (1963)
Effect of cycloheximide on the immune response
Antimicrobiological Agents and Chemotherapy 1962, 1 - 9
- CURTIUS, H. CH., D. HEINTEL, S. GHISLA, TH. KUSTER, W. L. RIMBACH
and A. NIEDERWIESER (1985)
Tetrahydrobiopterin biosynthesis. Studies with specially
labeled (2H) NAD(P)H and 2H₂O and of enzymes involved
Eur. J. Biochem. 148, 413 - 419

- CURTIUS, H. CH., H. MÜLDNER and A. NIEDERWIESER (1982)
Tetrahydrobiopterin: Efficiency in endogenous depression and
Parkinson's disease
J. Neural. Transmission 55, 301 - 308
- CURTIUS, H. CH., A. NIEDERWIESER, M. VISCONTI, A. OTTEN, J. SCHAUB,
S. SCHEIBENREITER and H. SCHMIDT (1979)
Atypical phenylketonuria due to tetrahydrobiopterin deficiency.
Diagnosis and treatment with tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin
and sepiapterin
Clin. Chim. Acta 93, 251 - 262
- DAUGERAS, N., A. BRISSON, F. LAPOINTE-BOULU and F. LACHIVER (1976)
Thyroidal iodine metabolism during the development of the chick
embryo
Endocr. 98, 1321 - 1331
- DHONDT, J. L., P. ARDOUIN, J. M. HAYTE and J. P. FAIRRAUX (1981)
Developmental aspects of pteridine metabolism and relationship
with phenylalanine metabolism
Clin. Chim. Acta 116, 143 - 152
- DHONDT, J. L. and J. M. HAYTE (1986)
The role of the kidney in biopterin metabolism
In: Chemistry and Biology of Pteridines, COOPER, B. A. and
WHITEHEAD, V. M. (eds.) Walter de Gruyter & Co, Berlin/New York
395 - 398
- DHONDT, J. L., J. M. HAYTE, G. FORZY and M. DEICROIX (1986)
Developmental aspects of biopterin metabolism in human
In: Chemistry and Biology of Pteridines, COOPER, B. A. and
WHITEHEAD, V. M. (eds.) Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York
239 - 242
- DUCH, D. S., S. W. BOWERS and C. A. NICHOL (1986)
Role of the pituitary in the regulation of tetrahydrobiopterin
in non neuronal tissues
In: Chemistry and Biology of Pteridines, COOPER, B. A. and
V. M. WHITEHEAD, (eds.) Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York
219 - 222
- DUCH, D. S., C.-L. LEE, M. P. EDELSTEIN and C. A. NICHOL (1983)
Biosynthesis of tetrahydrobiopterin in the presence of
dihydrofolate reductase inhibitors
Molec. Pharmacol. 24, 103 - 108
- DUCH, D. S., W. SEATON, J. BOWERS, H. WOOLF and C. A. NICHOL (1984)
Biopterin cofactor biosynthesis: GTP-cyclohydrolase, neopterin
and biopterin in tissues and body fluids of mammalian species
Life Sciences 35, 1895 - 1901

- FINK, M., U. JELEN, W. WILMANN, H. ROKOS and I. ZIEGLER (1983)
Neopterin in plasma and urine and biopterin in blood
fractions after bone marrow transplantation
In: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines
CURTIUS, H. CH., W. PFLEIDERER and H. WACHTER (eds.)
Walter de Gruyter & Co, Berlin/New York, 223 - 234
- FISCHER, D. A., S. HOATH and J. LAKSMANAM (1982)
The thyroid hormone effects on growth and development may be
mediated by growth factors
Endocr. Exp. 16, 259 - 271
- FORREST, H. J., E. GLASSMANN and H. K. MITCHELL (1956)
Conversion of 2-amino-4-hydroxypteridine to isoxanthopterin
in *Drosophila melanogaster*
Science, 124, 725 - 726
- FORREST, H. J., M. MEANDER and J. ALEXANDER (1966)
Studies of the pteridines in the milkweed bug, *Oncopeltus*
fasciculatus
J. Insect. Physiol. 12, 1411 - 1421
- FREEMAN, B. M. (1964)
Studies on the oxygen requirements and hatching mechanism
of the domestic fowl
Ph. D. thesis, Univ. of Leicester
- FREMMER, R. E. (1984)
Die Embryogenese des Huhns unter dem Einfluß von L-Thyroxin,
Thioharnstoff, Cycloheximid und Chloramphenicol
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
- FRIEDMANN, P. A., A. H. KAPPELMANN and S. KAUFMANN (1972)
Partial purification and characterisation of tryptophan
hydroxylase from rat hindbrain
J. Biol. Chem. 247, 4165 - 4173
- FROST, S.K., L. G. EPP and S. J. ROBINSON (1984)
The pigmentary system of developing axolotls
J. Embryol. exp. Morph. 81, 105 - 125
- FUCHS, D., A. HAUSEN, C. HUBER, R. MARGREITER, G. REIBNEGGER,
M. SPIELBERGER and H. WACHTER (1982)
Pteridinausscheidung als Marker für Alloantigen-induzierte
Lymphozytenproliferation
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 661 - 664
- FUCHS, D., A. HAUSEN, C. HUBER, G. REIBNEGGER and H. WACHTER
(1984 a)
Urinary neopterin in the diagnosis and follow up of neoplasia:
A biochemical parameter to detect cellmediated immune response
Tumour Biology 5, 199 - 209

- FUCHS, D., A. HAUSEN, M. KOFLER, H. KOSANOWSKI, G. REIBNEGGER
and H. WACHTER (1984 b)
Neopterin as an index of immune response in patients with
tuberculosis
Lung, 162, 337 - 346
- FUKUSHIMA, T., and J. C. NIXON (1980)
Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues
and fluids
Anal. Biochem. 102, 176 -188
- FUKUSHIMA, T., J. ETO, T. NAYUNI; W. RICHTER, S. GOODSEN and
T. SHIOTA (1975)
Biosynthesis of pteridines in mammalian systems
In: Chemistry and Biochemistry of Pteridines
PFLEIDERER, W. (ed.), Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York
247 - 261
- FUKUSHIMA, T. and T. SHIOTA (1974)
Biosynthesis of biopterin by chinese hamster ovary (CHO KL)
cell culture
J. Biol. Chem. 249, 4445 - 4451
- FULLER, R. C. and N. A. NUGENT (1969)
Pteridines and the function of the photosynthetic reaction
center
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 63, 1311 - 1318
- GAL, E. M. (1982)
Biosynthesis and function of unconjugated pterins in mammalian
tissues
Adv. Neurochem. 4, 83 - 148
- GARBER, A. J., M. J. BAUM, L. SALGANICOFF, E. FABER and
R. W. HANSON (1973)
The effects of cycloheximide on energy transfer in rat and
guinea pig liver mitochondria
J. Biol. Chem. 248, 1530 - 1535
- GORSKI, J. and M. C. AXMAN (1964)
Cycloheximide (actidione) inhibition of protein synthesis and
the uterine response to estrogen
Arch. Biochem. Biophys. 105, 517 - 520
- GROSSOWICZ, W. (1946)
Influence of thiourea on development of the chick embryo
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 63, 151 - 152
- HÄBERLE, D. A., H. Schiffel, G. MAYER, G. HENNINGS and
H. REMBOLD (1978)
Renal balance of pterin cofactors in the rat
Pflügers Arch. 375, 9 - 16

- HALPERN, R.; B. C. HALPERN, B. STEA, A. DUNLAB, K. CONKLIN,
B. CLARK, H. ASHE, L. SPERLING, J. A. HALPERN, D. HARDY and
R. A. SMITH (1977)
Pterin-6-aldehyde, a cancer cell metabolite: Identification
and application in diagnosis and treatment of human cancer
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 74, 587 - 591
- HAMA, T. and M. OBIKA (1960)
Pterin synthesis in the amphibian neural crest cells
Nature, 187, 326 - 327
- HANSBOROUGH, L. A. and M. KHAN (1951)
The initial function of the chick thyroid gland with the use
of radioiodine 131
J. Exp. Zool. 116, 447 - 453
- HARRIS, S. E. and H. S. FORREST (1967)
Inhibition by certain pteridines of ribosomal RNA and DNA
synthesis in developing oncopeltus eggs
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 58, 89 - 94
- HASLER, TH. and A. NIEDERWIESER (1986)
Tetrahydrobiopterin producing enzyme activities in liver of
animals and man
In: Chemistry and Biology of Pteridines, COOPER, B. A. and
V. M. WHITEHEAD (eds.) Berlin/New York, 319 - 322
- HAUSEN, A., D. FUCHS, G. REIBNEGGER, H. WACHTER, D. EGG and
R. GÜNTHER (1983)
Neopterin as index for activity of disease in patients with
rheumatoid arthritis
In: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines Vol. 2
CURTIUS, H. CH., W. PFLEIDERER and H. WACHTER (eds.)
Walter de Gruyter, Berlin/New York, 245 - 250
- HAUSEN, A. and H. WACHTER (1982)
Pteridines in the assessment of neoplasia
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 593 - 602
- HENNINGER, R. W. and W. S. NEWCOMER (1964)
Plasma protein binding, half-life and erythrocyte uptake
of thyroxine and triiodothyronine in chickens
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 116, 624 - 628
- HILFER, S. R. (1964)
Follicle formation in the embryonic chick thyroid
I. Early morphogenesis
J. Morph. 115, 135 - 152
- HOPKINS, F. G. (1889)
Note on a yellow pigment in butterflies
Nature, 40, 335

HOPKINS, F. G. (1895)

XV. The pigments of the pieridea; a contribution to the study of excretory substances, which function in ornament
Phil. Trans. Roy. Soc. (London) Ser. B, 186, 661 - 682

HOPKINS, M. L. (1935)

Development of the thyroid gland in the chick embryo
J. Morph. 58, 585 - 613

HUBER, CH., J. R. BATCHELOR, D. FUCHS, A. HAUSEN, A. LANG,
D. NIEDERWIESER, G. REIBNEGGER, P. SWETKY, J. TROPPMAIR and
H. WACHTER (1984)

Immune response associated production of neopterin.
Release from macrophages primarily under control of
interferon-gamma
J. Exp. Med. 160, 310 - 316

JAFFE, M. (1886)

Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem
Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Creatinins
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 10, 391 - 400

KAICK, V. G. und K. GRÖTTLER (1968)

Technik und Probleme teratologischer Studien am bebrüteten
Hühnerkeim
Kurze wiss. Mitt. 17

KAPATOS, G., S. KATOH and S. KAUFMANN (1982)

Biosynthesis of biopterin by rat brain
J. Neurochem. 39, 1152 - 1162

KATOH, S., S. SUEOKA and S. YAMADA (1979)

Studies of the cofactor of phenylalanine hydroxylase in
some transportable rat ascites hepatomas
In: Chemistry and Biology of Pteridines, KISLIUK, R. L.
and G. M. BROWN (eds.), Elsevier/North-Holland, New York
189 - 194

KAUFMANN, S. and D. B. FISHER (1962)

Pteridin-requiring amino acid hydroxylation
In: Oxygenases, HAYAISHI (ed.), Academic Press, New York
285 - 370

KAUFMANN, S., G. KAPATOS, W. B. RIZZO, J. D. SCHULMAN, L. TAMARKIN
and G. R. VAN LOON (1983)

Tetrahydrobiopterin therapy of hyperphenylalaninaemia due
to defective synthesis of tetrahydrobiopterin
Ann. Neurol. 14, 308 - 315

KERN, P., H. ROKOS and M. DIETRICH (1984)

Raise in serum neopterin levels and imbalances of T-lympho-
cyte subsets in viral diseases, acquired immune deficiency
and related lymphadenopathy syndroms
Biomed. Pharmacotherapy, 38, 407 - 411

- KERRIDGE, D. (1958)
The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*
J. Gen. Microbiol. 19, 497 - 506
- KOKOLIS, N., N. MYLONOS and I. ZIEGLER (1972)
Pteridine and riboflavin patterns during tail regeneration in *Triturus* species and the effects of chloramphenicol, isoxanthopterin and reserpine
Z. Naturforsch. 27b, 285 - 291
- KRIVI, G. G. and G. M. BROWN (1979)
Purification and properties of the enzymes from *Drosophila melanogaster*, that catalyze the synthesis of sepiapterin from dihydroneopterintriphosphat
Biochem. Genet. 17, 371 - 390
- LAGOWSKI, J. M. and H. S. FORREST (1967)
Interaction in vitro between isoxanthopterin and DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 58, 1541 - 1547
- LEACH, B. E., J. H. FORD and A. J. WHIFFEN (1947)
Actidione, an antibiotic of *Streptomyces griseus*
J. Am. Chem. Soc. 69, 474
- LEDERER, E. (1939)
Les pigments des invertébrés (à l'exception des pigments respiratoires)
Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 15, 273 - 306
- LEEMING, R. J., J. A. BLAIR, A. GREEN and D. N. RAINE (1976)
Biopterin derivatives in normal and phenylketonuric patients after oral loads of L-phenylalanin, L-tyrosin and L-tryptophan
Arch. Dis. Child. 51, 771 - 777
- L'HELIAS, C., J. PROUST, I. EBELS and C. A. SALENINK (1984)
Létal mutations in *Drosophila melanogaster* induced by direct or indirect action of pteridines
Mutation Research 128, 147 - 152
- LOVENBERG, W., R. A. LEVINE, D. S. ROBINSON, M. EBERT, A. C. WILLIAMS and D. B. CAHNE (1979)
Hydroxylase cofactor activity in cerebrospinal fluid of normal subjects and patients with Parkinson's disease
Science, 204, 624 - 626
- MATSUBARA, Y. and G. E. GAULL (1985)
Biopterin and neopterin in various milks and infant formulas
Am. J. Clin. Nutr. 41, 110 - 112

- MORGAN, E. J. (1930)
Xanthin-oxidase in the avian embryo
Biochem. J. 24, 410 - 414
- MOORE, K. L. (1985)
Embryologie
MOORE (ed.) Schattenauer 2. Aufl. Stuttgart/New York 144 - 148
- MORI, Y., J. MATSUMOTO and T. HAMA (1960)
On the properties of cyprinopourpe, A 2, a pterin isolated
from the skin of cyprinidae and it's relation to ichthyopterin
or 7-hydroxypterin
Z. Vergl. Physiol. 43, 531 - 543
- NAGATSU, T., M. LEVITT and S. UDENFRIEND (1964)
Tyrosinhydroxylase, the initial step in norepinephrin
biosynthesis
J. Biol. Chem. 239, 2910 - 2917
- NEW, D. AT. (1956)
The formation of sub-plastodermic fluid in hens' eggs
J. Embryol. exp. Morph. 4, 221 - 227
- NICHOL, C. A., G. K. SMITH and D. S. DUCH (1985)
Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and
molybdopterin
Ann. Rev. Biochemistry 54, 729 - 764
- NIEDERWIESER, A., H. CH. CURTIUS and R. GITZELMANN (1980)
Excretion of pterins in phenylketonuria and phenylketonuria
variants
Helv. Paediatr. Acta 35, 335 - 342
- NIEDERWIESER, A., D. FUCHS, A. HAUSEN, G. JUDMAIER, G. REIBNEGGER,
H. WACHTER and C. HUBER (1985)
Neopterin as a new biochemical marker in the clinical assess-
ment of ulcerative colitis
Immunbiol. 170, 320 - 326
- OPPENHEIM, R. W. (1973)
Prehatching and hatching behaviour. Comperative and physio-
logical considerations.
In: Behaviour Embryology, GOTTLIEB, G. (ed.)
Academic Press, New York, 163 - 244
- OPPENHEIMER, J. H., W. H. DILLMANN, H. L. SCHWARTZ and H. C. TOWLE
(1979)
Nuclear receptors and thyroid hormone action: a progress report
Fed. Proc. 38, 2154 - 2161

- PFLEIDERER, W. (1964)
Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie
In: Angewandte Chemie, Int. Engl. Ed. 3 IV, 113 - 156
- PURRMANN, R. (1940 a)
Über die Flügelpigmente der Schmetterlinge VII
Liebigs Ann. Chem. 544, 182 - 190
- PURRMANN, R. (1940 b)
Die Synthese des Xanthopterins
Liebigs Ann. Chem. 546, 98 - 102
- PURRMANN, R. (1941)
Konstitution und Synthese des sogenannten Anhydroleukopterins
Liebigs Ann. Chem. 548, 284 - 292
- PRUY, J. (1982)
Die Aktivität der Xanthindehydrogenase und ihr Einfluß auf
die Harnsäurebildung in der embryonalen Kükensleber
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
- RAO, G. N. and E. COTLIER (1985)
Biosynthesis of neopterin, sepiapterin and biopterin in rat
and human ocular tissues
Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 26, 768 - 770
- REMBOLD, H., V. CHANDRASHEKAR and P. SUDERSHAN (1971)
Catabolism of pteridine cofactors. IV. In vivo catabolism
of reduced pteridines in rat
Biochim. Biophys. Acta 237, 365 - 368
- REMBOLD, H. und B. L. GUYRE (1972)
Biochemie der Pteridine
Angew. Chem. 84, 1088 - 1098
- REMBOLD, H., H. METZGER and W. GUTENSOHN (1971 a)
Catabolism of pteridine cofactors. III. On the introduction
of an oxygen function into position 6 of the pteridine ring
Biochim. Biophys. Acta 230, 117 - 126
- REMBOLD, H., H. METZGER, P. SUDERSHAN and W. GUTENSOHN (1969 a)
Catabolism of pteridine cofactors. I. Properties and
metabolism in rat liver homogenates of tetrahydrobiopterin
and tetrahydroneopterin
Biochim. Biophys. Acta 184, 386 - 396
- REMBOLD, H. and F. SIMMERBACH (1969 b)
Catabolism of pteridine cofactors. II. A specific pterin
deaminase in rat liver
Biochim. Biophys. Acta 184, 589 - 596

- ROKOS, H., G. BIENHAUS and R. KUNZE (1985)
Neopterin in serum of mammals
In: Biochemical and clinical Aspects of Pteridines Vol.4
Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York, 313 - 318
- ROKOS, H., K. ROKOS, H. FRISIUS and H. J. KIRSTAEDTER (1980)
Altered urinary excretion of pteridines in neoplastic
disease. Determination of biopterin, neopterin, xantho-
pterin and pterin
Clin. Chim. Acta 105, 275 - 286
- ROMANOFF, A. L. (1960)
The Avian Embryo
ROMANOFF, A. L. (ed.) Macmillan, New York, 865 - 878
- ROMANOFF, A. L. (1967)
Biochemistry of the Avian Embryo
WILEY, J. & Sons (eds.) New York, London, Sydney
- ROMANOFF, A. L. and H. LAUFFER (1956)
The effect of injected thiourea on the development of some
organs of the chick embryo
J. Physiol. 92, 219 - 227
- SACHS, L. (1974)
In: Angewandte Statistik
Springer 230 - 238
- SAITO, Z., W. G. MARTIN and W. H. COOK (1965)
Changes in the major macromolecular fractions of egg during
embryogenesis
Can. J. Biochem. 43, 1755 - 1770
- SAMUELS, H. H. and L. E. SHAPIRO (1976)
Thyroid hormone stimulates de novo growth hormone synthesis
in cultured GH₁-cells: Evidence for accumulation of a rate
limiting RNA species in the introduction process
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 3369 - 3373
- SANCHEZ-URRETIA, L., C. E. PIERCE and O. GREENGARD (1978)
Dihydropteridine reductase activity of adult, fetal and
neoplastic tissues
Enzyme 23, 346 - 352
- SAWADA, Y., H. SHINTAKU, J. SUYAMA, G. JSSHIKI, Y. HASE, Y. OKANO,
H. YAMATO, T. TSURUKURA and T. OURA (1986)
Therapy in utero of fetuses with BH₄ deficiency
In: Chemistry and Biochemistry of Pteridines, COOPER, B. A.
and WHITEHEAD, V. M. (eds.), Walter de Gruyter & Co. Berlin/
New York, 247 - 250

- SCHMIDT, P. (1986)
Über die Funktion des aviären Kallikrein-Kinin- und Angiotensin-Renin-Systems bei der Auslösung der Lungenatmung des Huhns
Inauguraldissertation, Tierärztl. Fakultät München
- SCHMUTZHARD, E., D. FUCHS, A. HAUSEN, H. LUTZ, G. REIBNEGGER und H. WACHTER (1984 a)
Neopterinausscheidung bei Malaria
Österr. Gesellschaft f. Biochemie u. Klin. Chemie
Bd. 365, 946
- SCHMUTZHARD, E., D. FUCHS, A. HAUSEN, G. REIBNEGGER und H. WACHTER (1984 b)
Neopterinausscheidung im Harn von Lebrapatienten
Österr. Gesellschaft f. Biochemie u. klin. Chemie
Bd. 365, 946
- SCHÖPF, C. und R. REICHERT (1941)
Zur Kenntnis des Leukopterins
Liebigs Ann. Chem. 548, 82 - 94
- SCHÖPF, C. und H. WIELAND (1926)
Über das Leukopterin, das weiße Flügelpigment des Kohlweißlings
Ber. Deut. Chem. Ges. 59, 2067 - 2072
- SEELIG, H. P. und H. WÜST (1969)
Die Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion
Das Ärztliche Laboratorium 15, 34 - 39
- SHAIN, W. G., S. R. HILFER and V. G. FONTE (1972)
Early ontogenesis of the embryonic chick thyroid.
1. Morphology and biochemistry
Develop. Biol. 28, 202 - 218
- SHIOTA, T. (1971)
In: Comprehensive Biochemistry, FLORKIN, M. and E. M. STOTZ (eds.)
Elsevier, Amsterdam 21, 111 - 119
- SIEGEL, M. R. and H. D. SISLER (1963)
Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide
Nature 200, 675 - 676
- SMALL, E. D., P. KOKA and J. LEE (1980)
Lumazine protein from the bioluminescent bacterium Photobacterium phosphorum
J. biol. chemistry 255, 8804 - 8810

- SMITH, G. K. and C. A. NICHOL (1984)
Two new tetrahydropterin intermediates in the adrenal medullary de novo biosynthesis of tetrahydrobiopterin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 761 - 766
- SMITH, G. K. and C. A. NICHOL (1986)
Synthesis, utilisation and structure of the tetrahydrobiopterin intermediates in the bovin adrenal medullary de novo biosynthesis of tetrahydrobiopterin
J. Biol. Chem. 261, 2725 - 2737
- SMITH, I. (1974)
Atypical phenylketonuria accompanied by severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatment
Arch. Dis. Child. 49, 245 - 263
- SMITH, I., K. HYLAND, B. KENDALL and R. LEEMING (1985)
Clinical role of pteridine therapy in tetrahydrobiopterin deficiency
J. Inher. Metab. Dis. 8. Suppl. 1, 39 - 45
- SMITH, R. C. and H. S. FORREST (1969)
The pattern of pteridine accumulation in egg of *Phyrrocoris apterus*
J. Insect. Phys. 15, 953 - 958
- SMITH-GILL, S. J. and V. CARVER (1981)
Biochemical characterisation of organ differentiation and maturation
Metamorphosis 2nd Edition, GILBERT, L. J. and E. FRIEDER (eds.)
Plenum Press, New York/London
- STEA, B., R. M. HALPERN, B. C. HALPERN and R. A. SMITH (1980)
Quantitative determination of pterins in biological fluids by high performance liquid chromatography
J. of Chromatography 188, 363 - 375
- STEA, B., R. M. HALPERN, B. C. HALPERN and R. A. SMITH (1981)
Urinary excretion levels of unconjugated pterins in cancer patients and normal individuals
Clin. Chim. Acta 113, 231 - 242
- STOLL, R. and B. BLANQUET (1952)
Sur l'activité des thyroïdes de l'embryon de poulet étudiée à l'aide du radio-iode 131
Ann. Endocrinol. 13, 569 - 577
- SWITCHENKO, A. C., J. P. PRIMUS and G. M. BROWN (1984)
Intermediates in the enzymatic synthesis of tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 754 - 760

- TANAKA, K., M. AKINO, Y. HAGI, M. DOI and T. SHIOTA
The enzymatic synthesis of sepiapterin by chick kidney preparations
J. Biol. Chem. 256, 2963 - 2972
- TAUROG, A. (1970)
Thyroid peroxidase catalyzed iodination of thyroglobulin: inhibition by iodide excess
Arch. Biochem. Biophys. 139, 212 - 220
- THOMMES, R. C. (1958)
Vasculogenesis in selected endocrine glands of normal and hypophysectomized chick embryos. I. The thyroid
Growth 22, 243 - 264
- THOMMES, R. C. and V. W. HYLKA (1977)
Plasma iodothyronines in the embryonic and intermediate post-hatch chick
Gen. comp. Endocrinol. 32, 417 - 422
- THOMMES, R. C. and V. W. HYLKA (1978)
Hypothalamo-adenohypophyseal-thyroid interrelationships in the chick embryo. I. TRH and TSH sensitivity
Gen. comp. Endocrinol. 34, 193 - 200
- THOMMES, R. C. and S. A. TONETTA (1979)
Hypothalamo-adenohypophyseal-thyroid interrelationships in the chick embryo. II. Effects of thiourea treatment on plasma total thyroxine levels and thyroidal I 131 uptake
Gen. comp. Endocrinol. 37, 167 - 176
- THOMMES, R. C., R. L. VIETH and S. LEVASSEUR (1977)
The effects of hypophysectomy by means of surgical decapitation on thyroid function in the developing chick embryo. I. Plasma thyroxine
Gen. comp. Endocrinol. 31, 29 - 36
- TIETZ, A., M. LINDBERG and E. P. KENNEDY (1964)
A new pteridine requiring enzymesystem for the oxidation of glyceryl-ethers
J. Biol. Chem. 239, 4081 - 4090
- TRAKATELLIS, A. C., M. MONTJAR and A. E. AXEBROD (1965)
Effect of cycloheximide on polysomes and protein synthesis in the mouse liver
Biochemistry 4, 1065 - 1071
- TROPPMAIR, J., A. LANG, C. HUBER, G. SCHOEDEN, A. NIEDERWIESER and G. ADOLF (1985)
Intracellular changes in pterin releasing peripheral blood mononuclear cells after stimulation with interferon-gamma
In: Biology and Chemistry of Pteridines Vol. 4
WACHTER, H., CH. CURTIUS and W. PFLEIDERER (eds.), Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York 363 - 368

- TRUNNEL, J. B. and F. T. BRAYER (1953)
Factors governing the development of the chick embryo thyroid.
I. Determination of the time at which I 131 collection begins
J. clin. Endocrin. Metab., 13, 88 - 94
- TRUNNEL, J. B. and P. WADE (1955)
Factors governing the developmet of the chick embryo thyroid.
II. Chronology of the synthesis of iodinated compounds studied
by chromatography analysis
J. clin. Endocrin. Metab. 15, 107 - 117
- TSUJITA, M. and S. SAKURAI (1963)
The association of a specific protein with yellow pigments
(dihydropterin) in silkworm Bombyx mori
Japan. J. Gen. 38, 97 - 105
- VIVEROS, O. H., M. M. ABOU-DONIA, J. C. NIXON and C. A. NICHOL (1981)
Biopterin cofactor biosynthesis independent regulation of GTP-
cyclohydrolase in adrenal medulla and cortex
Science 213, 349 - 350
- WACHTER, H., D. FUCHS, A. HAUSEN and G. REIBNEGGER (1982)
Importance of pteridines for regulation of growth
In: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines Vol. 1,
WACHTER, H., CH. CURTIUS and W. PFLEIDERER (eds.),
Walter de Gruyter & Co. Berlin/New York 277 - 280
- WACHTER, H., A. HAUSEN und K. GRASSMAYR (1979)
Erhöhte Ausscheidung von Neopterin im Harn von Patienten
mit malignen Tumoren und Viruserkrankungen
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1957 - 1960
- WATT, W. B. and S. R. BOWDEN (1966)
Chemical phenotypes of pteridine colour forms in pieris
butterflies
Nature 210, 304 - 306
- WEISS, A. (1979)
Der Einfluß des Thyroxins und Thioharnstoffs auf bio-
chemische Vorgänge der Kükenleber in der perinatalen Phase
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
- WENTHWORTH, B. C. and W. J. MELLEN (1961)
Circulating thyroid hormones in domestic birds
Poult. Sci. 40, 1275 - 1283
- WENDTHWORTH, B. C. and R. K. RINGER (1986)
Thyroids
In: Avian physiology, P. D. STURKIE (ed.) Springer New York
452 - 465

- WETTERSTEIN, F. O., H. NOLL and S. PENMAN (1964)
Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged
in protein synthesis in vitro
Biochim. Biophys. Acta 87, 525 - 528
- WIELAND, H. und K. LIEBIG (1944)
Ergänzende Beiträge zur Kenntnis der Pteridine
Justus Liebigs Ann. Chem. 555, 146 - 156
- WIELAND, H. und C. SCHÖPF (1925)
Über den gelben Flügelfarbstoff des Zitronenfalters
(*Gonepteryx rhamni*)
Ber. Deut. Chem. Ges. 58, 2178 - 2183
- WITTMANN, J. (1978)
Der perinatale Stoffwechsel der Kükenleber und seine Beeinflussbarkeit
Habil. Schrift, Institut für Tierphysiologie, Tiermed.
Fakultät München
- WITTMANN, J., W. KUGLER and H. KOLB (1984)
Influence of L-thyroxine and thiourea on metabolism and
lung respiration in embryonic chicks
In: Respiration and metabolism of embryonic vertebrates,
SEYMOUR, R. S. (ed.), Dordrecht, Boston/London 310 - 318
- WOLLMAN, S. H. and E. ZWILLING (1953)
Radioiodine metabolism in the chick embryo
Endocr. 52, 526 - 535
- ZIEGLER, I. (1960)
Tetrahydrobiopterin-Derivat als lichtempfindliche Verbindung
bei Amphibien und Insekten
Z. Naturf. 15 b, 460 - 465
- ZIEGLER, I. (1965)
Pteridine als Wirkstoffe und Pigmente
In: Ergeb. Physiol. Biol. chem. exp. Pharmacol. 56, 1 - 66
- ZIEGLER, I. (1984)
Pteridine formation during lectin induced activation of
mouse spleen lymphocytes
In: Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines Vol. 3
PFLEIDERER, W., H. WACHTER and H. CH. CURTIUS (eds.), Walter de
Gruyter & Co. Berlin/New York 265 - 274
- ZIEGLER-GRÜNDER, I. (1956)
Untersuchungen über die Purine und Pterinpigmente in der
Haut und in den Augen von Weißfischen
Zeitschrift f. vergleich. Physiol. 39, 163 - 189

ZIEGLER, I., U. HAMM and J. BERNDT (1983)

Participation of pteridines in the control of lymphocyte
stimulation and lymphoblast proliferation
Cancer Research 43, 5356 - 5359

ZIEGLER, I., H. J. KOLB, U. BODENBERGER and W. WILMANN (1982)

Biopterin level in blood cells as a marker for hemopoetic
cell proliferation during autologous bone marrow trans-
plantation in Beagle dogs
Blut 44, 261 - 270

Allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. M. Merkenschlager danke ich für die Überlassung des Themas.

Besonders danke ich Herrn Priv.Doiz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann für die hilfreiche Betreuung und viele wertvolle Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. M. Goldberg für die geduldige und hilfreiche Unterstützung bei technischen und wissenschaftlichen Fragen.

Frau U. Seliger danke ich für ihre Mithilfe bei den Versuchen und bei der Gestaltung der graphischen Darstellungen.

Lebenslauf

Johann Naumann, geboren am 7. August 1959 in
Trautmannshofen, Bayern

- | | |
|-------------|--|
| 1979 | Reifezeugnis des Ostendorfer - Gymnasiums
in Neumarkt/Opf. |
| 1979 - 1980 | Wehrdienst |
| 1980 - 1985 | Studium der Tiermedizin an der
Ludwig - Maximilian - Universität München |
| 1986 | Approbation als Tierarzt |
| 1986 - 1987 | Doktorand am Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungs -
physiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München |

